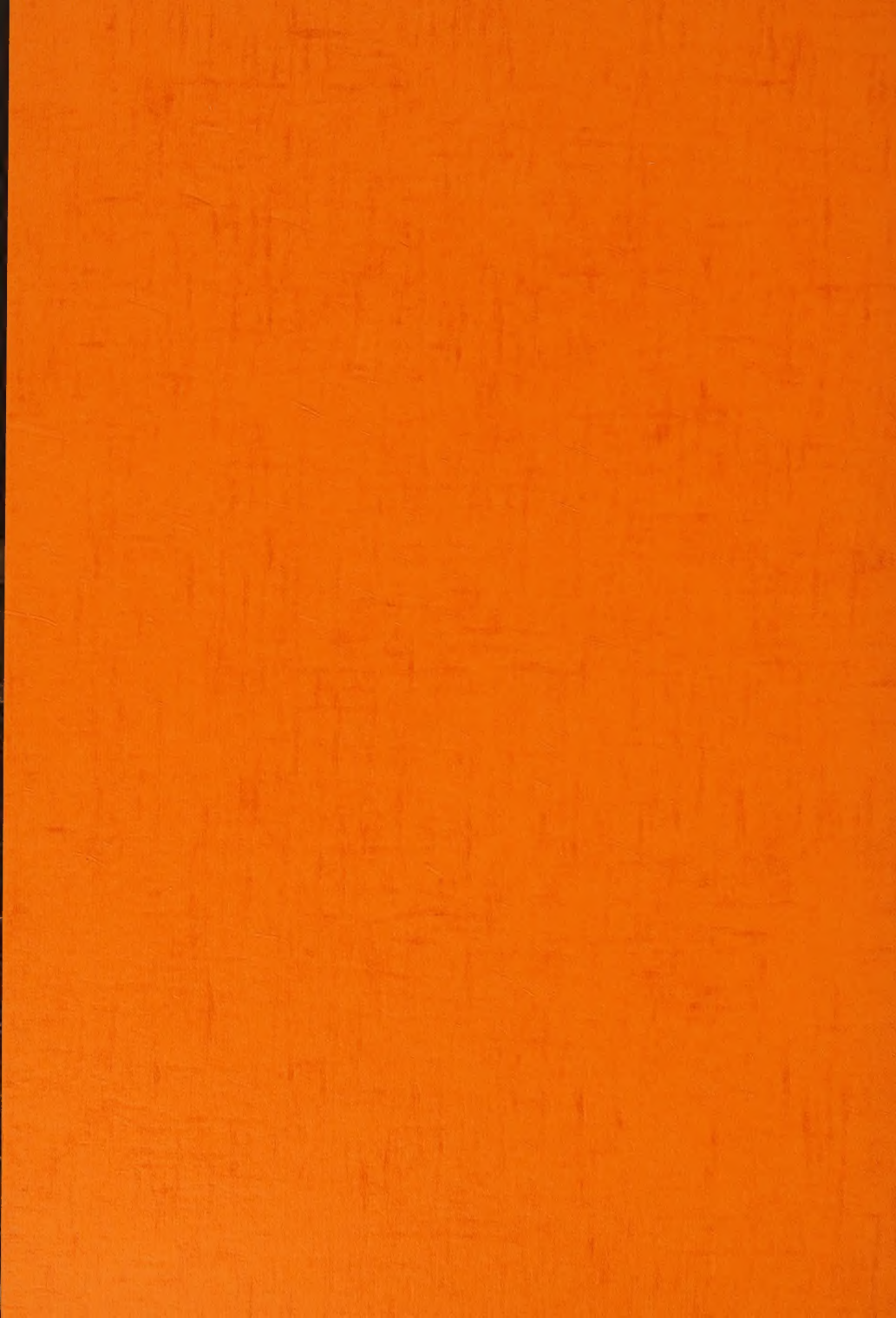


**DAS HÄMOCYANIN DREIER SPINNENARTEN:
ISOLIERUNG UND
CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG**

Jürgen Markl
—

1976
—



DAS HÄMOCYANIN DREIER SPINNENARTEN:
ISOLIERUNG UND CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der

Ludwig - Maximilians - Universität
München

vorgelegt von Jürgen Markl aus Bischofswiesen

Juni 1976



1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernt Linzen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Roland Theimer

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 7. 1976

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut
der Universität München unter Anleitung
von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Linzen für das
Thema, den Arbeitsplatz, zahlreiche wertvolle Anregungen,
sowie seine ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Ferner danke ich herzlich Frau Helga Geisert für die
technische Anfertigung der Zeichnungen und allen meinen
Kollegen für die angenehme Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG.....	1
B. MATERIAL UND METHODEN.....	4
1. Chemikalien.....	4
2. Tiere, Tierhaltung und Hämolymphegewinnung.....	5
3. Vorbehandlung der Proteine.....	5
a) Dialyse.....	5
b) Präparative Ultrazentrifugation.....	5
c) Denaturierung.....	6
d) SH-Gruppen-Alkylierung.....	6
e) Alkalische Dissoziation.....	6
f) Bromcyanspaltung.....	6
4. Elektrophoresen.....	6
a) Analytische Disc-Elektrophorese.....	6
b) Präparative Disc-Elektrophorese.....	7
c) Analytische SDS-Acrylamid-Elektrophorese.....	7
d) SDS-Molekulargewichtsbestimmung.....	7
e) Präparative SDS-Acrylamid-Elektrophorese.....	7
f) Anfärbung und Auswertung der Gele.....	7
5. Isoelektrofokussierung.....	8
a) Isoelektrofokussierung in Acrylamidgelen.....	8
b) Isoelektrofokussierung in einem Sucrose-Dichte- gradienten.....	8
c) Trägerfreie Isoelektrofokussierung im Silikonschlauch.....	8
d) Isoelektrofokussierung in Sephadex G 75-Platten..	8
e) Auswertung der Fokussierungsversuche.....	9
6. Gelfiltration.....	9
7. Proteinbestimmung.....	10
8. Aminosäureanalyse.....	10
a) Automatische Analyse.....	10
b) Methioninbestimmung.....	10
c) Tryptophanbestimmung.....	10
9. Kupferanalyse.....	11
10. Eisenanalyse.....	11
11. Analyse proteingebundener Kohlenhydrate.....	11
12. Endgruppenbestimmung.....	12
C. ERGEBNISSE.....	13
1. Die Hämolympheproteine und ihre Polypeptidketten...13	
a) Anzahl und Charakter der Hämolympheproteine.....13	
b) Anzahl, Zuordnung und Größe der Polypeptidketten.14	
2. Isolierung von Hämocyaninen im präparativen Maßstab.....	22
a) Präparative Ultrazentrifugation.....	22
b) Gelfiltration.....	22

c)	Isoelektrofokussierung.....	25
d)	Präparative Disc-Elektrophorese.....	29
3.	Chemische Untersuchung der isolierten Hämocyanine und Begleitproteine.....	30
a)	Kupferanalyse.....	30
b)	Eisenanalyse.....	31
c)	Aminosäureanalyse.....	31
d)	Kohlenhydratanalyse.....	37
e)	Analyse der N-terminalen Aminosäure.....	42
4.	Bromcyanspaltung.....	43
D.	DISKUSSION.....	49
1.	Die kleinste strukturelle Untereinheit der Hämocyanine.....	49
2.	Das Begleitprotein.....	54
3.	Chemische Analyse des Spinnenhämocyanins.....	56
a)	Aminosäureanalyse.....	56
b)	Kohlenhydratanalyse.....	57
c)	N-terminal-Analyse.....	57
4.	Bromcyanspaltung des Spinnenhämocyanins.....	58
E.	ZUSAMMENFASSUNG.....	63
F.	LITERATURVERZEICHNIS.....	65

A. EINLEITUNG

Hämocyane sind nach den Hämoglobinen die bedeutendsten Atmungspigmente im Tierreich. Im aktiven Zentrum befinden sich zwei Kupferatome, über die der Sauerstoff auf noch unbekannte Weise gebunden wird. Das Vorkommen von Hämocyaninen bei vielen Vertretern der Gastropoden und Cephalopoden einerseits und der Xiphosuren, Crustaceen und Arachniden andererseits scheint die Hypothese von der nahen stammesgeschichtlichen Verwandtschaft der beiden großen Tierstämme der Mollusken und Arthropoden zu stützen, doch sind die strukturellen Unterschiede zwischen Mollusken- und Arthropodenhämocyanin bedeutend. Arthropodenhämocyanin baut sich aus einer funktionellen Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 75000 Dalton auf (entsprechend einem Sedimentationskoeffizienten von 5S) und bildet kubische Aggregate, bestehend aus sechs, zwölf oder vierundzwanzig solcher Monomere, die miteinander in einem von vielen Parametern abhängigen Gleichgewicht stehen und in der Ultrazentrifuge mit Swedberg-Konstanten von 16S, 24S und 37S sedimentieren. Die kleinste funktionelle Untereinheit von Molluskenhämocyanin hat dagegen ein Molekulargewicht von 50000 Dalton. Bei den Cephalopoden bilden sechzig bis achtzig solche Monomere ein zylindrisches Aggregat, welches bei den Gastropoden noch dimerisiert.

Hämocyane sind also Riesenproteine, die bei Gastropoden Molekulargewichte von sechs bis acht Millionen Dalton erreichen, damit in der Natur nur von Viruspartikeln übertroffen werden und fast einen Übergang zu Zellorganellen darstellen. Ein solches Molekül besitzt eine weit über den Rahmen einer normalen Quartärstruktur hinausgehende Überstruktur mit bis zu 320 Kupferatomen bzw. 160 aktiven, sauerstoffbindenden Zentren. Auf der anderen Seite sind Hämocyane als Atmungspigmente physiologischen Untersuchungen relativ leicht zugänglich, was die Erforschung von Korrelationen zwischen Struktur und Funktion begünstigt. Zusammenfassungen zum Stand der Hämocyaninforschung geben Ghiretti (1968) sowie van Holde und van Bruggen (1971).

Die meisten der zahlreichen Veröffentlichungen über Hämocyanine beschäftigten sich mit Problemen der Quartärstruktur und der Sauerstoffbindung; demgegenüber traten rein chemische Studien bisher stark in den Hintergrund. Bei diesen sind zwei Tendenzen zu erkennen: Der überwiegende Teil der Arbeitsgruppen behandelt das von ihnen untersuchte Hämocyanin als im Monomerbereich einheitlich und charakterisiert es durch Analyse der Aminosäurezusammensetzung, der Kohlenhydratkomponente (Hämocyanine sind Glycoproteide) und der endständigen Aminosäuren (z.B. Dijk et al., 1970; Albergoni et al., 1972; Waxman, 1975). Demgegenüber bezweifeln andere Autoren die Homogenität des Hämocyanins ihrer Versuchstiere und bemühen sich vorerst um den Nachweis strukturell sowie funktionell verschiedener Monomere (z.B. Loehr und Mason, 1973; Murray und Jeffrey, 1974; Sullivan et al., 1974).

Trotz intensiver Bemühungen in einer Reihe von Laboratorien bestehen jedoch nach wie vor zahlreiche Widersprüche vor allem bezüglich der Identität der Endgruppen und Kohlenhydratkomponenten sowie der Anzahl und Größe der Polypeptidketten und deren Spaltprodukte. Hierbei stoßen Untersuchungen an Molluskenhämocyaninen auf besondere Schwierigkeiten infolge einer dort vorliegenden Verknüpfung von jeweils sechs bis acht kleinsten funktionellen Einheiten über kovalente Bindungen (Brouwer und Kuiper, 1973; Siezen und van Bruggen, 1974; Waxman, 1975). Die Arthropodenhämocyanine zeigen dieses Phänomen nicht, was eine Strukturforschung erleichtern sollte, doch auch hier lassen sich artspezifische Unterschiede offenbar nur schwer auf eine gemeinsame Formel bringen.

So finden sich z.B. bei der N-terminal-Analyse von Hämocyaninen aus Crustaceen in drei Arbeiten drei verschiedene Endgruppen (Carpenter und van Holde, 1973; Stewart et al., 1973; Waxman, 1975). Kennzeichnend für die vorhandenen Schwierigkeiten mag ebenfalls sein, daß trotz der bisher weit über hundert Veröffentlichungen über Hämocyanine erst 1975 die reproduzierbare Bromcyanspaltung eines Hämocyanins gelang (Waxman, 1975). Es war also von Interesse, die bisherigen Erkenntnisse durch Untersuchungen an einem neuen Hämocyanintyp zu erweitern.

Zahlreichen Arbeiten am Hämocyanin von wasserlebenden Gliederfüßlern (Crustaceen, Xiphosuren) stehen nur wenige Befunde bei den Arachniden gegenüber, der großen Gruppe mit Hämocyanin ausgestatteter Landarthropoden. Loewe (1972) fand, daß die Hämolympheproteine der Spinnen *Cupiennius salei* und *Dugesia californica* zumindest überwiegend Hämocyanin darstellen und in der Ultrazentrifuge Sedimentationskoeffizienten von 16S und 24S (*Cupiennius*) bzw. 16S und 37S (*Dugesia*) aufweisen. Die kleinste funktionelle, also noch sauerstoffbindende Unter-einheit wurde durch alkalische Dissoziation erhalten, sedimentierte mit 5-6S und hatte ein Molekulargewicht von 85000 Dalton. Diese Befunde sind für Arthropodenhämocyanine typisch. Versuche von Czichos-Tiedt (1975), die Hämolympheproteine der Spinne *Cupiennius* mittels analytischer Disc-Elektrophorese aufzutrennen, führten jedoch nicht zu zwei, sondern zu drei Banden, da sich die 16S-Einheit in zwei Komponenten teilte. Dies konnte entweder die Existenz zweier verschiedener Hämocyanine oder aber das Vorhandensein eines Begleitproteins unbekannter Natur bedeuten. Für beide Möglichkeiten gab es Hinweise.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den Hämolympheproteinen dreier Spinnenarten und beschreibt die Auffindung eines vom Hämocyanin verschiedenen Begleitproteins, die präparative Isolierung und die chemische Charakterisierung der drei Hämocyanine und Begleitproteine sowie Versuche zur Frage, ob durch Spaltung mit Bromcyan reproduzierbare, für eine Sequenzanalyse geeignete Bruchstücke zu erhalten sind.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Alle Reagenzien waren von p. A. Qualität. Sie wurden von MERCK bezogen mit Ausnahme von:

Biogel A5m	BIORAD, Richmond, Californ.
Biogel P 10	
Eichproteine für die MG-Bestimmung	BOEHRINGER, Mannheim
Biochemica Test-Combination Glucose	
Anthron	FLUKA, Neu-Ulm
Amino acid calibration-standard	HAMILTON, Whittier, Californ.
D-Xylose (Pentose) Test-Combination	HOFFMANN - LA ROCHE, Basel, Schweiz
Stickstoff	LINDE, München
Ampholine pH 3-6	LKB - PRODUKTER, Bromma, Schweden
Ampholine pH 4-6	
Ampholine pH 3.5-10	
Ultrogel AcA22	
Polygram Fertigfolien:	MACHEREY - NAGEL, Düren
Cellulose MN 300	
Polyamid 6	
Sephadex G-75	PHARMACIA, Uppsala, Schweden
Sephadex G-150	
Acrylamid	SCHUCHARDT, München
N, N'-Methylenbisacrylamid	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	
Coomassie Brilliant Blue	SERVA, Heidelberg
Guanidin-Hydrochlorid	
Dansyl-Chlorid	
Kollektion Dansyl-AS I	
Bromcyan	
Ninhydrin	
Dowex 1 X 8	
Dowex 50 X 12	
N-Acetyl-Neuraminsäure	SIGMA, München

2. Tiere, Tierhaltung und Hämolymphegewinnung

Cupiennius salei Keyserling ist eine mittelamerikanische Kammspinnenart, die seit ca. zwanzig Jahren an diesem Institut gezüchtet wird. Beschreibungen der Haltung finden sich bei Melchers (1963) sowie Loewe et al. (1970). Es wurde nur Hämolymphe von weiblichen Tieren verwendet, welche gegenüber der von Männchen keinen Unterschied in der Proteinzusammensetzung aufweist (Czichos-Tiedt, 1975), aber reichlicher zur Verfügung stand.

Dugesiella californica und *Eurypelma* (*Dugesiella*) *helluo* sind zwei Vogelspinnenarten aus dem Süden der USA, die nach Comstock (1965) zur gleichen Gattung (*Dugesiella*) gehören. Ihre Haltung wurde von Loewe (1972) beschrieben. Die Hämolymphe wurde ohne Beachtung des Geschlechts verwendet. Die Hämolymphegewinnung erfolgte bei allen drei Spinnenarten wie bei Loewe (1972) durch Punktion des dorsal gelegenen Herzens, wobei die Tiere vorher einige Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ gekühlt worden waren. Die Mortalität der Spinnen nach der Blutentnahme konnte durch reichliche Wasserzufuhr und besonders bei *Cupiennius* durch Aufscheuchen nach dem Wiedererwärmen fast auf null gesenkt werden. Die Hämolymphe wurde stets in einer Eppendorf-Zentrifuge (2-4 Min., 10000 UpM) zellfrei gemacht, was die Gerinnung verhinderte. Zur Anwendung kamen entweder frische oder tiefgefrorene Proben; tiefgefrorene Hämolymphe zeigt über mehrere Wochen hinweg keine Veränderungen (Czichos-Tiedt, 1975).

3. Vorbehandlung der Proteine

a) Dialyse: Wenn nicht anders beschrieben erfolgte die Abtrennung niedermolekularer Bestandteile durch Dialyse gegen 0.01 M Natriumphosphatpuffer pH 7.2 .

b) Präparative Ultrazentrifugation: Nach 24-stündiger Zentrifugation der Hämolymphe in der Beckman-Zentrifuge Modell L (Rotor W 50) bei 2°C und 40000 UpM wurde ein "Pellet" erhalten, welches nach Lösung in 0.01 M Phosphatpuffer für zahlreiche qualitative Untersuchungen verwendet wurde.

c) Denaturierung: 1 mg Protein wurde in 1 ml Puffer aufgenommen, der 1 % β -Mercaptoäthanol enthielt sowie entweder 1-5 % SDS (0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7.2), 6 M Harnstoff (0.1 M Tris/Boratpuffer pH 9.6) oder 8 M Guanidin-HCl (0.1 M Tris/HCl-Puffer pH 8.5). Inkubiert wurde 20 Minuten bei 56°C (SDS) bzw. 4 Minuten bei 95°C und anschließend 120 Minuten bei 37°C (SDS, Harnstoff, Guanidin-HCl).

Mit Guanidin-HCl denaturiertes Protein wurde, einer Vorschrift von Weber et al. (1972) folgend, zunächst ausgiebig gegen 9 M Harnstoff in 0.1 M Tris/HCl-Puffer pH 8.2 dialysiert, anschließend, ebenso wie im Falle des mit Harnstoff denaturierten Proteins, gegen 0.01 M Phosphatpuffer pH 7.2 (0.01 % SDS). Die Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte gelelektrophoretisch.

d) SH-Gruppen-Alkylierung: Die SH-Gruppen-Alkylierung erfolgte nach einer Vorschrift von Weber et al. (1972) mit Jodessigsäure.

e) Alkalische Dissoziation: Dialyse des Proteins bei +4°C über 3 Tage gegen 10 mM Na_2EDTA in Natriumbicarbonatpuffer pH 10.1 ($I = 0.1$) oder in 0.1 M Tris/Boratpuffer pH 9.75 .

f) Bromcyanspaltung: 1 mg Protein und 1-5 mg Bromcyan wurden in 1 ml 70-proz. Ameisensäure oder in 1 ml 0.1 N Salzsäure gelöst. Die Inkubation erfolgte über 24-96 Stunden bei Raumtemperatur oder bei +4°C . Anschließend wurde das Inkubat zweimal im Rotationsverdampfer zu Trockne gebracht und in einigen Versuchen noch zweimal lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.2 (2 % SDS) oder in 1 N Essigsäure aufgenommen.

4. Elektrophoresen

a) Analytische Disc-Elektrophorese: Verwendet wurden 5-proz. Acrylamidgele; in den meisten Fällen kam das System 6 nach Maurer (1968) mit 0.01 M Veronal/Tris pH 7.0 (Elektrodenpuffer) und 0.05 M Tris/HCl pH 7.5 (Gelpuffer) zur Anwendung, wobei die Laufzeit 1 Stunde bei 300 V betrug.

b) Präparative Disc-Elektrophorese: Die Versuche erfolgten im System 6 nach Maurer (1968) in einer Elektrophoreseapparatur der Firma WTW (Weilheim) bei einer Kühlmanteltemperatur von $+2^{\circ}\text{C}$. Die Länge der Gelsäule betrug 3 cm, die aufgetragene Proteinmenge 15-20 mg. Zu Versuchsbeginn wurden 1200 V konstant gehalten, bis 30 mA erreicht waren, die von da ab konstant gehalten wurden. Im übrigen wurde nach der Bedienungsanleitung der Firma WTW vorgegangen.

c) Analytische SDS-Acrylamid-Elektrophorese: Die Versuche erfolgten bei pH 7.25 nach Weber und Osborn (1969) in 7.5 bis 15-proz. Gelen, bei pH 8.0 nach Loehr und Mason (1973) in 8-proz. Gelen sowie bei pH 9.6 nach Kaltschmidt und Wittmann (1970,1971), wobei abweichend von der Vorschrift die Gele 7.5 % Acrylamid und 0.1 % SDS enthielten.

d) SDS-Molekulargewichtsbestimmung: Als Eichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung dienten in verschiedenen Kombinationen (Molekulargewicht der Polypeptidkette in Klammern): Phosphorylase a (97000), Rinderserumalbumin (68000), Katalase (60000), Pyruvat-Kinase (57000), Fumarase (49000), Ovalbumin (43000), Aldolase (40000), Glycerinaldehyd-3-P-DH (36000), Chymotrypsinogen A (26000) und Cytochrom c (12500).

Eichproteine und Probe wurden im selben Gel elektrophoretisiert und dann der Gel-Scan zur Auswertung verwendet.

e) Präparative SDS-Acrylamid-Elektrophorese: Diese Versuche zur Auftrennung von Bromcyanbruchstücken erfolgten in der Apparatur der Firma WTW bei einer Kühlmanteltemperatur von $+2^{\circ}\text{C}$ unter Anwendung des Systems nach Loehr und Mason (1973). Die Gelsäule (12-proz. Gel) war 6 cm hoch. Die Laufzeit betrug 24 Stunden bei 240 V (ca. 100 mA). Als Elutionspuffer diente 0.1 M Tris/Essigsäure pH 8.0.

f) Anfärbung und Auswertung der Gele: Die Banden wurden mit dem proteinspezifischen Coomassie BB nach Bramhall et al. (1969) oder nach Kahn und Rubin (1975) gefärbt.

Die Gelauswertung erfolgte densitometrisch mit Hilfe einer von der Werkstatt des Instituts gebauten Apparatur. Die Extinktion bei 546 nm wurde von einem log-Schreiber aufge-

zeichnet und die Mengenverhältnisse durch Flächenintegration bestimmt. Kahn und Rubin (1975) konnten nach Anfärben von Gelen mit 0.1-proz. Coomassie BB in 25-proz. wässriger TCA-Lösung ein lineares Verhältnis zwischen eingesetzter Proteinmenge und der Extinktion der Banden bei 546 nm nachweisen.

5. Isoelektrofokussierung

a) Isoelektrofokussierung in Acrylamidgelen: Grundlage der Versuche mit nativen Proteinen war das System von Gainer (1973) unter Verwendung von "Ampholine" pH 3.5-10. Die Versuchsdauer betrug 8 Stunden bei 120 V.

Die Fokussierung denaturierter Proteine fand im System von Miller und Elgin (1974) statt, wobei "Ampholine" pH 3-6 zur Anwendung kam. Die Versuchsdauer betrug 6 Stunden bei 200 V. In beiden Fällen wurden die Gele vor dem Anfärben mit Coomassie BB mehrere Tage in mehrfach gewechselter 20-proz. TCA gewaschen und anschließend in einer wässrigen Lösung mit 50 % Methanol und 7 % Eisessig gespült.

b) Isoelektrofokussierung in einem Sucrose-Dichtegradienten:

Die Versuche erfolgten in der 110 ml-Säule der Firma LKB nach den Angaben der Bedienungsanleitung. Verwendet wurde "Ampholine" pH 4-6. Die Spannung betrug zunächst 6 Stunden lang 600 V, anschließend 72 Stunden lang 1000 V. Eingesetzt wurden 3 mg Protein bei einem Fraktionsvolumen von 1 ml.

c) Trägerfreie Isoelektrofokussierung im Silikonschlauch:

Die Fokussierung erfolgte nach Macko und Stegemann (1970) unter gewissen Veränderungen der Versuchsanordnung. 110 cm Silikonschlauch ($\varnothing$ 4 mm) wurden auf ein Metallrohr von 10 mm $\varnothing$ gewickelt. Das ergab 21 Windungen, die in 2.5 cm Abstand Markierungen trugen. 5-10 mg Protein wurden in 0.2 % "Ampholine" pH 4-6 zunächst bei 600 V fokussiert (12 Stunden), anschließend bei 1000 V (48 Stunden bis 14 Tage). Die Fraktionierung erfolgte durch Einfrieren und Zerschneiden des Schlauchs an den Markierungen.

d) Isoelektrofokussierung in Sephadex G 75-Platten: Nach

Radola (1975) wurde Sephadex G 75 (70 mg/ml Wasser), welches

2 % "Ampholine" pH 4-6 enthielt, auf einer Glasplatte von 22 x 12 cm Fläche in einer 1 mm dicken Schicht ausgegossen. Die Fokussierung fand in einer flachen, gekühlten Kammer statt, wobei die Gelplatte über Filterbrücken mit Anodenpuffer (0.5 % Schwefelsäure) und Kathodenpuffer (2 % Triäthanolamin) verbunden war. Es wurden 5-10 mg Protein in Anodennähe aufgetragen. Die Spannung betrug zunächst über 3 Stunden 200 V, anschließend über 12 Stunden 1200 V. Nach der Fokussierung wurden die in Form von Trübungen direkt sichtbaren Komponenten ausgekratzt und über Glaswolle vom Sephadex-Gel getrennt.

e) Auswertung der Fokussierungsversuche: Bei den Versuchen in Polyacrylamid und in Sephadex wurde vereinfachend ein linearer pH-Gradient angenommen. Genaue Bestimmungen mittels pH-Mikroelektrode erfolgten dagegen an den Fraktionen nach Fokussierung im Sucroседichtegradienten und nach Macko und Stegemann (1970). Außerdem wurden durch Messung der Extinktionen bei 280 nm und 340 nm Elutionsprofile erstellt und die einzelnen Gipfel durch Untersuchung in Acrylamidgelen charakterisiert.

6. Gelfiltration

In kleinerem Maßstab wurden Hämolympheproteine in 110 cm-Säulen mit 0.9 cm ϕ isoliert. Die Fraktionsgröße betrug 0.5-1.2 ml (30 Minuten). Zur Anwendung kamen Sephadex G 150, Biogel P 10, Biogel A5m und Ultrogel AcA22; die Vorbereitung der Gele erfolgte nach Anleitung der Firmen. Pro Versuch wurden 5-10 mg Protein eingesetzt.

Großisolierungen über Biogel A5m fanden in einer 110 cm-Säule mit 5.5 cm ϕ statt, wobei die Fraktionsgröße 7 ml betrug (15 Minuten). Aufgetragen wurden jeweils 250 mg Protein (5 ml Hämolymphe).

Zur Isolierung über Biogel A5m und Ultrogel AcA22 wurde 0.01 M Tris/HCl-Puffer pH 7.4 verwendet, zur Isolierung über Sephadex G 150 Bicarbonatpuffer pH 10.1 ($I=0.1$) und für die Chromatographie der Bromcyanspaltprodukte über Biogel P 10 1 N Essigsäure.

7. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte entweder grob durch Messung der Extinktion bei 280 nm (1 OD wurde gleich 1 mg Protein pro ml gesetzt) oder in speziellen Fällen genau durch den Test nach Lowry et al. (1951).

8. Aminosäureanalyse

a) Automatische Analyse: Die Protein-Hydrolyse erfolgte in 6 N HCl bei 110°C unter Stickstoffatmosphäre über 24, 48 und 96 Stunden; das Hydrolysat wurde anschließend zur Trockene gebracht und die Salzsäure noch zweimal mit wenig Wasser abgedampft. Die Analysen wurden mit dem Mikro-AS-Analysator "Chromatocord" der Firma Labotron nach den Anweisungen der Bedienungsanleitung durchgeführt. Versuchsbedingungen: Natriumcitratpuffer pH 3.07, 5.23 und 4.25; NaOH 0.2 N; Temperatur 45°/45°, 50°/50° oder 55°/55° ; Einstellung der Zeitgeber: Z1 = 1800, Z2 = 2900, Z3 = 4500, Z4 = 1200 .

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte nach dem Prinzip Halbwertsbreite x Höhe der Peaks. Es wurden durch eine Standardlösung (Fa. Hamilton) selbst ermittelte Korrekturfaktoren verwendet. Als interner Standard diente p-Nitrophenylalanin. Die Werte wurden bei einigen Aminosäuren (Thr, Ser, Val, Ile und Tyr) auf den Hydrolysezeitpunkt Null bzw. Unendlich extrapoliert.

b) Methioninbestimmung: Bei der Extrabestimmung von Methionin kam die durch Bolling (1951) modifizierte Methode von McCarthy und Sullivan (1941) zur Anwendung, wobei das Protein mit 3 N Salzsäure in 40 % Ameisensäure 13 Stunden lang bei 120°C hydrolysiert wird. Der anschließende photometrische Test beruht auf Reaktion mit Natriumnitroprussid.

c) Tryptophanbestimmung: Zur Tryptophanbestimmung diente der spektralphotometrische UV-Test von Bencze und Schmid (1957), wobei durch Lösung des Proteins in 0.1 N NaOH das tyrosinabhängige Maximum bei ca. 290 nm stark erhöht wird. Aus der Relation zwischen Tyrosin- und Tryptophanmaximum (ca. 280 nm), welche sich aus der Steigung einer angelegten

Tangente ergibt, berechnet sich unter Berücksichtigung des absoluten Maximums das molare Verhältnis Tyr/Trp, wobei die Tyrosinwerte den Ergebnissen der automatischen Aminosäureanalyse entnommen wurden.

Für die Versuche wurde natives und harnstoffdenaturiertes Protein verwendet.

9. Kupferanalyse

Kupfer wurde mit dem Atomabsorptionsspektrometer "400" der Firma Perkin-Elmer nach der Bedienungsanleitung bestimmt. Die Messung fand bei 324,7 nm statt. Der Meßbereich lag zwischen 1 und 10 ng. Als Standart wurde Kupfer(II)chlorid verwendet (Merck-Titrisol). Versuchsbedingungen:

- (1) Trocknen.....20 sec, 110°C (Einstellung: 132);
- (2) Pyrolysieren..25 sec, 620°C (Einstellung: 350);
- (3) Atomisieren...15 sec, 2550°C (Einstellung: 937);
- (4) Ausglühen.....10 sec, 2700°C (Einstellung: 999);

10. Eisenanalyse

Eisen wurde ebenfalls mit dem Atomabsorptionsspektrometer "400" nach der Bedienungsanleitung bestimmt. Die Messung fand bei 248,3 nm statt. Der Meßbereich lag zwischen 1 und 10 ng. Als Standart wurde Eisen(III)chlorid verwendet (Merck-Titrisol). Versuchsbedingungen:

- (1) Trocknen.....25 sec, 110°C (Einstellung: 132);
- (2) Pyrolysieren..40 sec, 620°C (Einstellung: 350);
- (3) Atomisieren...15 sec, 2500°C (Einstellung: 908);
- (4) Ausglühen.....15 sec, 2700°C (Einstellung: 999);

11. Analyse proteingebundener Kohlenhydrate

Die Bestimmung des Neutralzucker-Gesamtgehalts erfolgte mit Anthron-Reagens nach Roe (1955) entweder direkt an dialysiertem Protein oder nach Hydrolyse mit 1 N Schwefelsäure (2 Stunden bei 100°C) und anschließende Reinigung über 5 cm lange Säulen ($\varnothing$ 1 cm) mit einem Mischbett-Ionenaustauscher aus Dowex 1X8, 200-400 mesh (OH⁻-Form) und Dowex 50X12, 200-400 mesh (H⁺-Form). Die Vorbereitung der Ionenaustauscher erfolgte nach Anweisung der Firma Dow Chemicals.

Die einzelnen Neutralzucker wurden nach Hydrolyse und Reinigung (wie oben) durch Dünnschichtchromatographie identifiziert, der Arbeit von Dijk et al. (1970) folgend. Die Chromatogramme wurden stets zweifach entwickelt; neben der eindimensionalen kam auch die zweidimensionale Chromatographie zur Anwendung; unter kombiniertem Einsatz zweier Laufmittel. Als Färbereagens diente Anilinphthalat, welches bei Betrachtung im UV-Licht (350 nm) eine Unterscheidung der Neutralzuckertypen auch nach Farben ermöglicht.

Glucose wurde außerdem mit Hilfe eines Testsatzes der Firma Boehringer nach der Hexokinase-Methode enzymatisch nachgewiesen sowie quantitativ bestimmt. Die ungefähre quantitative Abschätzung der übrigen Neutralzucker war durch Vergleich der Fleckengrößen möglich.

Die Analyse der Aminozucker erfolgte durch Hydrolyse mit 3.5 N HCl (4 Stunden, 110°C) unter Stickstoffatmosphäre, Entfernung der Salzsäure, Bindung an Dowex 50X12, Elution mit 1 N HCl, Konvertieren mit Ninhydrin in die korrespondierenden Pentosen (Stoffyn und Jeanloz, 1954) sowie Reinigung über Mischbett-Ionenaustauscher (wie oben). Die Pentosen wurden dünn-schichtchromatographisch identifiziert; hierbei wird Glucosamin durch Arabinose und Galaktosamin durch Lyxose repräsentiert. Zur quantitativen Bestimmung kam ein pentosespezifischer photometrischer Test der Firma Hoffmann-La Roche zur Anwendung, der auf Reaktion mit p-Bromanilin beruht (Roe und Rice, 1948). Die Untersuchung auf Neuraminsäuren erfolgte nach der Resorcin-Methode von Svennerholm (1957).

12. Endgruppenbestimmung

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren erfolgte nach der Dansyl-Methode von Hartley (1970) sowie nach dem daraus entwickelten Mikro-Dansyl-Verfahren von Weiner et al. (1972). Chromatographiert wurde auf Polyamid-6-Folien der Firma Macherey-Nagel.

C. E R G E B N I S S E

1. Die Hämolympheproteine und ihre Polypeptidketten

Wie in der Einleitung beschrieben, hatten die Untersuchungen von Loewe (1972) und Czichos-Tiedt (1975) gezeigt, daß in Spinnenhämolymphe eine Heterogenität des Hämocyanins sowie das Vorhandensein weiterer Proteine nicht ausgeschlossen werden konnte. Der folgende Abschnitt der Arbeit beschäftigt sich mit diesen Fragen.

a) Anzahl und Charakter der Hämolympheproteine: In nativer Hämolymphe aus *Cupiennius* hatte Loewe (1972) durch UZ-Untersuchungen ein 24S- und ein 16S-Protein gefunden. Diese Befunde konnte Czichos-Tiedt (1975) durch analytische Disc-Elektrophorese bestätigen, wobei sich die 16S-Einheit in eine Doppelbande auftrennte. Bei *Dugesia* liegt nach Loewe und Linzen (1973) ein 37S- und ein 16S-Protein vor, ebenso bei *Eurypelma* (Loewe, unveröffentlicht).

Bei der Disc-Elektrophorese wandern Proteine im elektrischen Feld durch ein Acrylamidgel; ihre Wanderungsgeschwindigkeiten und damit ihre Auftrennbarkeit sind abhängig vom Molekulargewicht und von der spezifischen Eigenladung der Proteine. Eigene Versuche mittels analytischer Disc-Elektrophorese führten, wie aus Abbildung 1 ersichtlich, bei *Cupiennius* zu drei Banden, die in einem konstanten Mengenverhältnis von 50 : 25 : 25 auftraten, bei den Vogelspinnen nur zu zwei Banden im konstanten Verhältnis 80 : 20, wobei die Zuordnung zu den angegebenen S-Werten auf UZ-Untersuchungen von R. Schmid (Diss., in Vorb.) zurückgeht.

Wie die unter C.3. beschriebene Charakterisierung isolierter Komponenten noch zeigen wird, handelt es sich nur bei der 37S-Einheit von *Dugesia* bzw. *Eurypelma* sowie bei der 24S- und der schnelleren der beiden 16S-Einheiten von *Cupiennius* um Hämocyanin (Hcy). Die langsamere 16S-Komponente von *Cupiennius* sowie die 16S-Einheiten der Vogelspinnen sind dagegen Begleitproteine (BP) unbekannter Funktion.

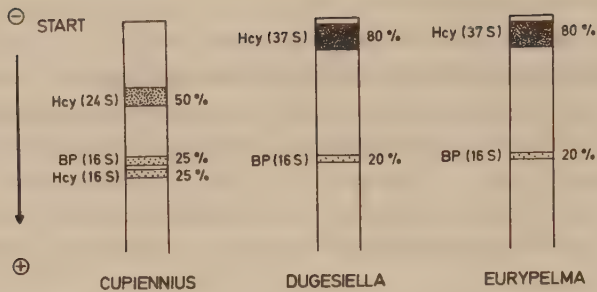


Abb. 1: Disc-Elektrophorese der Hämolympheproteine der drei Spinnenarten; 5-proz. Gele, System 6 aus Maurer (1968), 300 Volt, 60 Minuten.
Hcy = Hämocyanin BP = Begleitprotein

Fuller und Doolittle (1971) fanden in der Hämolymphe von *Panulirus i.* (Crustacea) ein Fibrinogen mit einem Molekulargewicht von 420000 Dalton. Loewe (1972) äußerte die Vermutung, *Cupiennius*-Hämolymphe könnte ein solches Fibrinogen enthalten. Czichos-Tiedt (1975) untersuchte den Überstand geronnener, zentrifugierter Hämolymphe aus *Cupiennius*, fand jedoch keine Veränderung im Bandenmuster. Eigene Gerinnungsversuche mit zellhaltiger Hämolymphe bestätigten dieses Ergebnis. Bei allen drei Spinnenarten fehlte das Begleitprotein im Überstand nicht. Nach diesen Befunden handelt es sich beim Begleitprotein nicht um ein Fibrinogen.

b) Anzahl, Zuordnung und Größe der Polypeptidketten: Während es noch nicht gelungen ist, Mollusken-Hämocyanin ohne Spaltung kovalenter Bindungen in kleinere Einheiten als in solche mit einem Molekulargewicht von 230-350000 Dalton zu zerlegen (z.B. Brouwer und Kuiper, 1973), zerfallen die bisher untersuchten Arthropoden-Hämocyanine unter dem Einfluß denaturierender Agenzien bis zur Größenordnung der kleinsten funktionellen Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ca. 75000 Dalton (Carpenter und van Holde, 1973; Murray und Jeffrey, 1974; Waxman, 1975).

In den Hämolympheproteinen der Spinnen *Cupiennius* und *Dugesia* wurden nach Inkubation mit SDS Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht um 80000 Dalton gefunden (Loewe, 1972; Czichos-Tiedt, 1975), daneben traten jedoch noch höhermolekulare Komponenten auf, die auf eine unvollständige Denaturierung schließen ließen.

Im Widerspruch zu allen oben genannten Arbeiten berichten andere Autoren von der Darstellung wesentlich kleinerer Polypeptidketten bei Mollusken (Dijk et al., 1970; Salvato et al., 1972) und Arthropoden (Pickett et al., 1966; Rizzotti, 1974).

Daher wurden die Hämolympheproteine der drei Spinnenarten nach unterschiedlichen Verfahren denaturiert, und zwar zunächst mit dem für gewöhnlich verwendeten Detergens SDS (1-5-proz.), aber auch mit 6 M Harnstoff, mit dem sehr stark denaturierend wirkenden Guanidin-Hydrochlorid (8 M) sowie mit 70-proz. Ameisensäure und mit 0.1 N Salzsäure. Die Reduktion eventuell vorhandener Disulfidbrücken wurde entweder durch 1 % β -Mercaptoäthanol oder durch SH-Gruppen-Alkylierung sichergestellt. Die anschließende SDS-Acrylamid-Elektrophorese nach Weber und Osborn (1969) zeigte ungeachtet der angewendeten Denaturierungsmethode bei allen drei Spinnenarten ein gleichartiges, gut reproduzierbares Muster von drei Proteinbanden, welches in Abbildung 2 wiedergegeben ist. Die Denaturierung wurde mit jedem der Agenzien quantitativ erreicht.

Um zu bestimmen, welchen der nativen Proteine (Abbildung 1) die einzelnen Polypeptidketten (Abbildung 2) zuzuordnen sind, wurde natives Hämolympheprotein durch analytische Disc-Elektrophorese aufgetrennt, die ungefärbten Banden einzeln herausgeschnitten, eluiert, denaturiert und dann im SDS-Acrylamidsystem reelektrophoretisiert. Es zeigte sich entsprechend dem in Abbildung 3 wiedergegebenen Schema eine Zerlegung des Begleitproteins in die beiden langsamer wandernden Polypeptidketten, welche daraufhin mit "BP1" und "BP2" bezeichnet wurden, während die Hämocyanine der drei Spinnenarten jeweils nur eine Polypeptidkette lieferten, die schnelle Hauptbande des SDS-Systems.

Die beiden Polypeptidketten der Begleitproteine traten stets

im Verhältnis 1 : 1 auf; ihr mengenmäßiger Anteil am Gesamtprotein betrug 25 % bei Cupiennius und 20 % bei den Vogelspinnen.

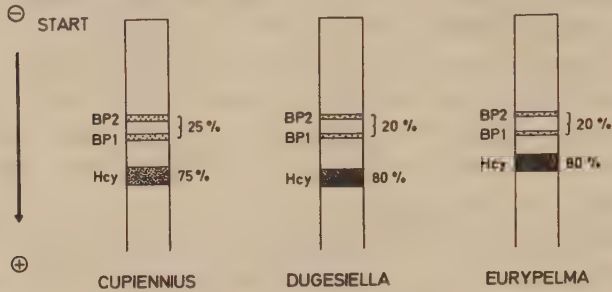


Abb. 2: Polyacrylamid-Elektrophorese der mit 1 % SDS denaturierten, reduzierten (1 % β -Mercaptoäthanol) Hämolympheproteine der drei Spinnen. System nach Weber und Osborn (1969), 7.5-proz. Gele, 8 mA/Gel, 3 Stunden.
Hcy = Polypeptidkette des Hämocyans
BP1/BP2 = Polypeptidketten des Begleitproteins

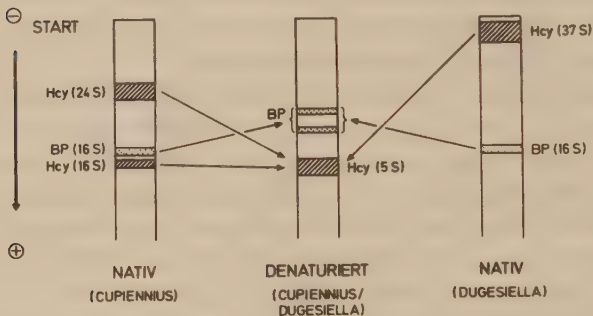


Abb. 3: Schematische Zuordnung der nativen Hämolympheproteine der Spinnen (rechtes bzw. linkes Gel; 5-proz. Gele, System 6 aus Maurer, 1968) zu ihren Polypeptidketten (mittleres Gel; 7.5-proz. Gel, System von Weber und Osborn, 1969).

Das anionogene Detergens SDS umgibt Proteinketten mit einer negativ geladenen Hülle und hebt so die spezifischen Ladungsunterschiede auf. Die bei Elektrophorese im Polyacrylamidgel zurückgelegten Wegstrecken sind dann nach Weber und Osborn (1969) linear vom Logarithmus der Molekülgrößen abhängig. Mit Hilfe von Eichproteinen lassen sich auf diese Weise Molekulargewichte bestimmen. In Abbildung 4 ist die Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptidketten aus Cupiennius schematisch wiedergegeben. Zur Absicherung der Werte wurden die Polypeptidketten der Hämolympheproteine und die der Eichproteine im selben Gel getrennt und die relativen Laufstrecken durch Scannen und Ausmessen im Registrierstreifen bestimmt.

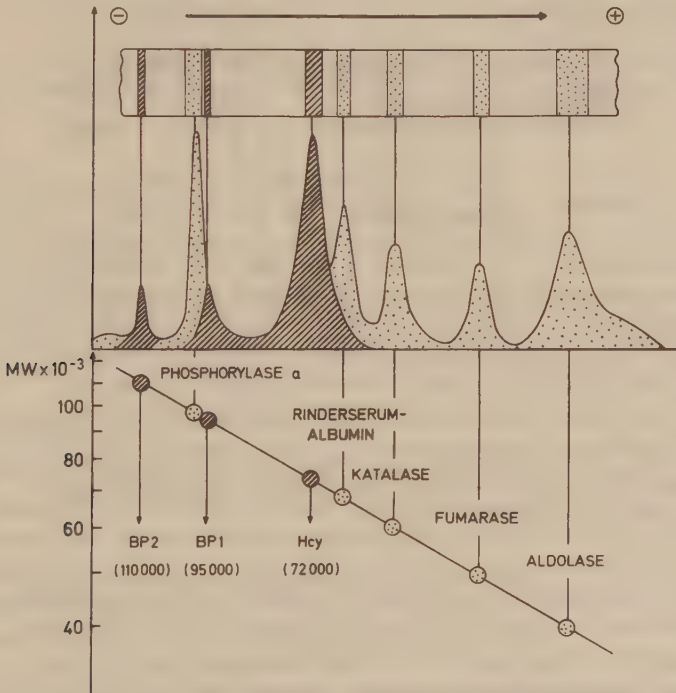


Abb. 4: Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptidketten der Hämolympheproteine von Cupiennius. Oben: Gel mit den 3 Polypeptidketten der Hämolympheproteine (schraffiert) sowie von 5 Eichproteinen (punktiert); Mitte: Gel-Scan; Unten: Eichgerade. Methode von Weber und Osborn (1969).

Für die Hämocyanin-Polypeptidkette von Cupiennius wurde auf diese Weise ein Molekulargewicht von 72000 Dalton ermittelt; Eurypelma-Hämocyanin wanderte etwas langsamer (74000 Dalton) und Dugesiella-Hämocyanin geringfügig schneller (71000 Dalton). Die beiden Polypeptidketten der Begleitproteine zeigten bei allen drei Spinnenarten Molekulargewichte von 95000 Dalton (BP1) und 110000 Dalton (BP2), wobei zur Ermittlung des höheren Wertes etwas extrapoliert werden mußte.

Die in Tabelle 1 zusammengefaßten Werte sind durch zahlreiche Versuche (n = 21) gut belegt, wobei auch Bestimmungen in den Systemen von Loehr und Mason (1973) sowie Kaltschmidt und Wittmann (1970, 1971) durchgeführt wurden, die zu den gleichen Ergebnissen führten.

Tabelle 1: Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung nach Weber und Osborn (1969) der Polypeptidketten aus Spinnenhämolymphe.
BP1/BP2 = Polypeptidketten des Begleitproteins

	Molekulargewicht (Dalton)		
	Hämocyanin	BP 1	BP 2
Cupiennius	72 000	95 000	110 000
Dugesiella	71 000	95 000	110 000
Eurypelma	74 000	95 000	110 000

In 70-proz. Ameisensäure fanden bei den Hämocyanin-Polypeptidketten allmählich proteolytische Spaltungen statt, was in 0.1 N Salzsäure nicht der Fall war. Nähere Untersuchungen hierzu finden sich unter C.4. .

Murray und Jeffrey (1974) hatten bei Cherax destructor (Crustacea) gefunden, daß sich 10 % des Hämocyanins bei der Denaturierung ohne Verwendung reduzierender Agenzien nur bis zum Dimer der Polypeptidkette zerlegen ließen. Dieser Anteil trat nur bei der Umsetzung des Dodekamers (25S) auf, nicht aber des Hexamers (17S).

Ein Verzicht auf reduzierende Agenzien bei der Denaturierung brachte zwar bei den Vogelspinnen keine Veränderung im

Bandenmuster der Hämolympheproteine, bei *Cupiennius* jedoch waren nur zwei Drittel des Hämocyanins bis zur Polypeptidkette zerlegt. Der Rest wurde, wie aus Abbildung 5 ersichtlich, durch eine neue Bande vom Molekulargewicht 140000 Dalton repräsentiert (Hämocyanin-Dimer).

Im Gegensatz zu den Befunden bei *Cherax d.* (Murray und Jeffrey, 1974) entstand dieser Dimeranteil sowohl aus der 24S- als auch aus der 16S-Hämocyaninkomponente, wie Versuche mit isolierten Einheiten ergaben.

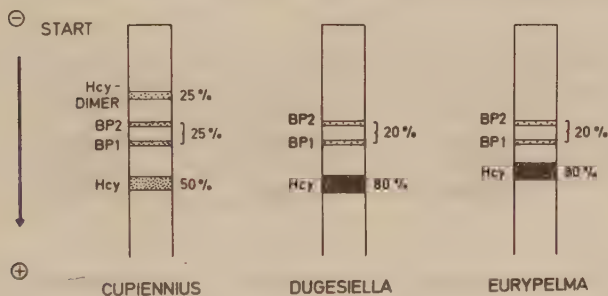


Abb. 5: Polyacrylamidelektrophorese der Hämolympheproteine der drei Spinnen nach Denaturierung mit 1 % SDS ohne Verwendung von β -Mercaptoäthanol. Bei *Cupiennius* tritt ein Dimer der Hämocyanin-Polypeptidkette auf. 7.5-proz. Gele, System von Weber und Osborn (1969), 8 mA/Gel, 180 Minuten.

Bei den Polypeptidketten des Begleitproteins aller drei Spinnenarten stellte sich bei Denaturierung mit SDS ohne Zusatz von reduzierenden Agenzien eine scheinbare Abnahme des Molekulargewichts der schwereren Bande (BP2) von 110000 Dalton auf 105000 Dalton ein; dieser Befund deutet auf das Vorhandensein einer intramolekularen Disulfidbrücke hin.

Loehr und Mason (1973) beobachteten bei der Elektrophorese von SDS-denaturiertem Hämocyanin aus *Cancer magister* (Crustacea) in einem speziellen Gelsystem unter Verwendung von β -Mercaptoäthanol zwei dicht hintereinanderlaufende Banden;

der Molekulargewichtsunterschied wurde zu ca. 8000 Dalton veranschlagt.

Die Elektrophorese von mit SDS denaturierten, reduzierten Hämolympheproteinen aus Spinnen im System von Loehr und Mason (1973) lieferte einen Hinweis auf eine mögliche Heterogenität der Vogelspinnenhämocyanine im Bereich der Polypeptidkette. Wie Abbildung 6 zeigt, verhielt sich das Hämocyanin aus Cupiennius in diesem Versuch einheitlich, das aus Vogelspinnen bot jedoch das Bild einer Doppelbande. Der Molekulargewichtsunterschied wurde auf maximal 1000 Dalton geschätzt.

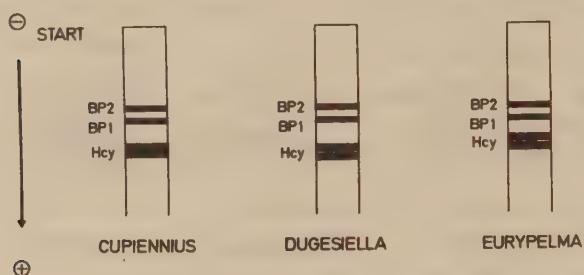


Abb. 6: Polyacrylamid-Elektrophorese der mit 1 % SDS denaturierten, reduzierten (1 % β -Mercaptoöthanol) Hämolympheproteine der drei Spinnen. System von Loehr und Mason (1973), 8-proz. Gele, 10 mA/Gel, 90 Minuten.

In einem durch Zusatz von SDS modifizierten Harnstoff-Polyacrylamid-System nach Kaltschmidt und Wittmann (1970, 1971) erfolgt eine Auftrennung des denaturierten, reduzierten Vogelspinnenhämocyanins in drei Banden, die in einem geschätzten Mengenverhältnis von 1 : 2 : 1 stehen (Abb. 7). Der Molekulargewichtsunterschied zwischen den 3 Banden lag nicht über 1000 Dalton.

Auch bei diesen Versuchen verhielten sich sowohl das Hämocyanin aus Cupiennius als auch die Begleitproteinketten einheitlich.

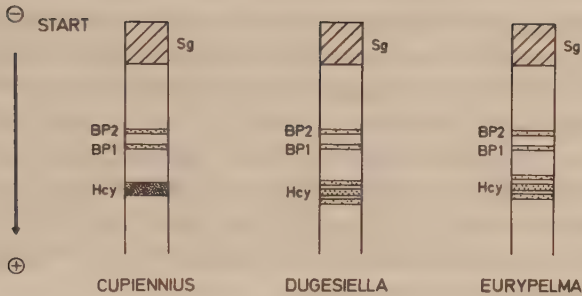


Abb. 7: Polyacrylamid-Elektrophorese der mit 1 % SDS und 6 M Harnstoff denaturierten, reduzierten (1 % β -Mercapto- α -Äthanol) Hämolympheproteine der drei Spinnen. System nach Kaltschmidt und Wittmann (1970, 1971), modifiziert; 7.5-proz. Gele, 6 M Harnstoff, 10 mM Na_2EDTA , 0.1 % SDS, 5 mA/Gel, 150 Minuten.
Sg = Sammelgel

Falls diese Ergebnisse nichtartifizuell sind, erscheint eine Heterogenität der Vogelspinnen-Hämocyanine im Bereich der Polypeptidketten möglich. Versuche zur Auftrennung der Hämolympheproteine bzw. ihrer Polypeptidketten nur auf Grund von Ladungsunterschieden ergaben jedoch für eine Einheitlichkeit der Hämocyanin-Polypeptidketten sprechende Befunde:

Die Auftrennung fand im elektrischen Feld in Acrylamidgelen statt, die als Trägermedium für einen aus speziellen Ampholyten ("Ampholine") aufgebauten pH-Gradienten fungierten. Bei dieser Isoelektrofokussierung wurde sowohl aus nativen als auch aus denaturierten Hämolympheproteinen stets eine kräftige und eine schwächere Bande erhalten, wobei die schwächere einen etwas basischeren isoelektrischen Punkt zeigte und auf Grund der Mengenverhältnisse wohl dem Begleitprotein gleichzusetzen ist. Die isoelektrischen Punkte der nativen Hämolympheproteine lagen zwischen pH 5-6, die der Polypeptidketten um pH 4.0.

Die Isoelektrofokussierung in Polyacrylamidgelen hatte neben dem Aspekt der Prüfung des Hämocyanins auf Ladungseinheitlichkeit noch eine gewisse Bedeutung als Vorversuch zur Isolierung von Hämocyaninen im präparativen Maßstab (siehe C.2.).

2. Isolierung von Hämocyaninen im präparativen Maßstab

Die bisherigen Untersuchungen im Verlauf dieser Arbeit hatten Hinweise geliefert, daß neben dem Hämocyanin noch ein weiteres Protein, dessen Natur unbekannt ist, in den Hämolymphe der drei untersuchten Spinnenarten vorliegt. Der nächste Schritt mußte also die Darstellung von isoliertem Hämocyanin und Begleitprotein im präparativen Maßstab sein. Die folgenden Methoden wurden zum Teil parallel zueinander entwickelt und dienten im besonderen Maß zur Absicherung der im 1. Ergebnisteil dargestellten Verhältnisse.

Die Identifizierung der bei den verschiedenen Trennverfahren auftretenden, durch Messung der Extinktion bei 280 nm (proteinspezifisch) und 340 nm (hämocyaninspezifisch) nachgewiesenen Komponenten erfolgte durch Disc-Elektrophorese und SDS-Polyacrylamidelektrophorese, wobei UZ-Untersuchungen von R. Schmid (Diss., in Vorb.) das Bild abrundeten. Von letzterem wurden auch die aufgeführten S-Werte übernommen.

a) Präparative Ultrazentrifugation: Die sehr hochmolekularen Molluskenhämocyanine lassen sich durch Ultrazentrifugation in Form eines "Pellets" ohne weiteres rein isolieren, was auch bei vielen Arthropodenhämocyaninen gelingt, sofern hier der Anteil nichthämocyaninartigen Hämolympheproteins gering ist (Übersicht siehe Ghiretti, 1968).

Die betreffenden Verhältnisse waren bei den Spinnen infolge des hohen Begleitproteinanteils ungünstiger. Die Ultrazentrifugation von Vogelspinnenhämolymphe führte zu einem Pellet, das neben dem Hämocyanin noch 2-5 % Begleitprotein enthielt, das Pellet des kleinemolekularen Cupiennius-Hämocyanins war sogar noch mit 10-20 % Begleitprotein verunreinigt.

b) Gelfiltration: Der hohe Molekulargewichtsunterschied zwischen 37S-Hämocyanin (ca. 1800 000 Dalton) und 16S-Begleitprotein (ca. 450 000 Dalton) der Vogelspinnen ermöglichte eine Auftrennung durch Molekularsiebchromatographie (= Gelfiltration).

Während zunächst unternommene Versuche mit Ultrogel Aca22 (60-140 mesh) zu keinen befriedigenden Ergebnissen führten,

gelang mit dem bereits von Roxby et al. (1974) zur Auftrennung der Komponenten des Hämocyanins aus *Callinassa c.* (Crustacea) verwendeten Biogel A5m (200-400 mesh) die vollständige Trennung von Hämocyanin und Begleitprotein aus Vogelspinnenhämolymphe. Abbildung 8 gibt das bei *Eurypelma* erhaltene Elutionsprofil wieder, welches mit dem bei *Dugesiiella* identisch war. Das isolierte Begleitprotein besaß kein spektrales Maximum bei 340 nm und erschien in konzentrierter Form gelblich gefärbt im Gegensatz zum bläulichen Hämocyanin.

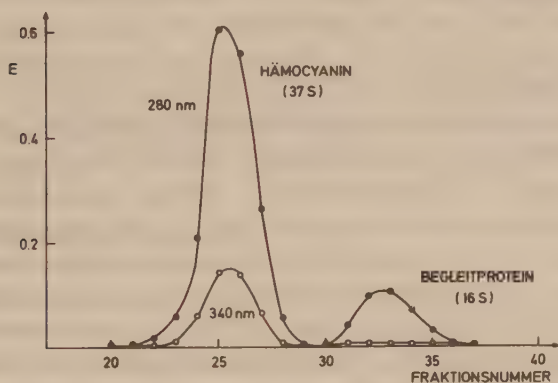


Abb. 8: Extinktionsverlauf bei 280 und 340 nm in den Fraktionen nach der Auftrennung der Hämolympheproteine von *Eurypelma* über Biogel A5m (Säulenlänge 110 cm). 10 mg Protein, 0.01 M Tris/HCl-Puffer pH 7.4, +4°C.

Auch die Auftrennung der Hämolympheproteine aus *Cupiennius* in die 24S-Hämocyaninkomponente und die 16S-Hämocyanin/Begleitproteinkomponente erwies sich mittels Biogel A5m als möglich, doch für diese Arbeit war eine weitgehend quantitative Hämocyaninausbeute in Hinblick auf später benötigte größere Materialmengen von Interesse. Der zur Gelfiltration notwendige Molekulargewichtsunterschied für eine Auftrennung von Hämocyanin und Begleitprotein wurde durch alkalische Dissoziation des Hämocyanins erzielt.

Bei der Dissoziation eines Proteins wird dessen Quartärstruktur stufenweise abgebaut, bis schließlich nur noch die native, tertiär gefaltete Polypeptidkette vorliegt. Die bisher untersuchten Hämocyane zeigen ein oft sehr unterschiedliches, aber für jede Art charakteristisches Dissoziations-Assoziationsverhalten in Abhängigkeit von pH, Ionenstärke, Proteinkonzentration und anderen Faktoren. Eine Übersicht hierzu findet sich bei Ghiretti (1968). Ungeachtet der artspezifischen Unterschiede neigen die Hämocyane alle bei hohem pH und Entzug zweiwertiger Kationen zur Dissoziation. Loewe und Linzen (1973, 1975) zeigten vermittels UZ-Untersuchungen, daß oberhalb von pH 9.5 bei den Hämocyaninen aus *Cupiennius* und *Dugesia* überwiegend die als kleinste funktionelle Einheit aufgefaßte 5S-Komponente auftritt.

In eigenen Versuchen wurde sowohl in Tris/Borat-Puffer, pH 9.75, als auch in Bicarbonatpuffer, pH 10.1, jeweils unter Zusatz von 10 mM EDTA, Vogelspinnenhämocyanin und *Cupiennius*hämocyanin vollständig in das Monomer (5S) zerlegt. Das Begleitprotein der drei Spinnenarten dissoziierte unter den gewählten Bedingungen nicht. Die Dissoziationsprodukte konnten anschließend durch Gelfiltration über Sephadex G 150 aufgetrennt werden; die Charakterisierung der isolierten Komponenten in der Ultrazentrifuge durch R.Schmid (Diss., in Vorb.) bestätigte das oben beschriebene unterschiedliche Dissoziationsverhalten von Hämocyanin und Begleitprotein. Das Ergebnis der Gelfiltration ist in Abbildung 9 am Beispiel von *Cupiennius* gezeigt. Die Elutionsprofile waren bei den drei Spinnenarten bis auf die Mengenverhältnisse zwischen Hämocyanin und Begleitprotein identisch (Vogelspinnen = 80 : 20; *Cupiennius* = 75 : 25). Die so gewonnenen Hämocyane zeigten kein Maximum bei 340 nm mehr, was einen Verlust zumindest der Sauerstoffbindungsfähigkeit infolge der Vorbehandlung bedeutete.

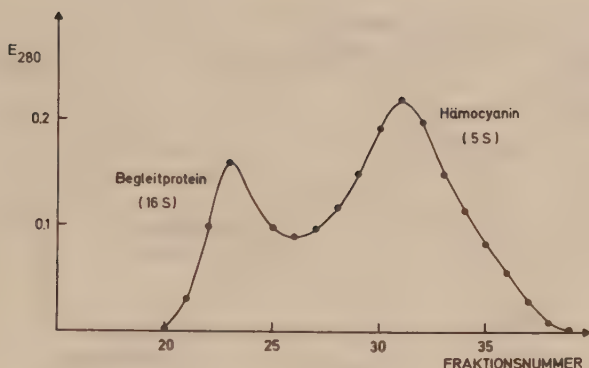


Abb. 9: Extinktionsverlauf bei 280 nm in den Fraktionen nach Trennung des alkalisch dissoziierten Hämocyanins vom undissoziierten Begleitprotein aus Cupiennius durch Gelfiltration über Sephadex G 150 (Säulenlänge 110 cm). 5 mg Protein, Bicarbonatpuffer pH 10.1 ($I = 0.1$), $+4^{\circ}\text{C}$.

c) Isoelektrofokussierung: Bei der Isoelektrofokussierung wandern Proteine in einem Trägermedium einen durch spezielle Ampholyte aufgebauten pH-Gradienten entlang bis zu ihrem isoelektrischen Punkt (IEP), an dem ihre positive und negative Ladung gleich groß ist, so daß sie ihre Wanderung einstellen. Die Trennung erfolgt also ausschließlich auf Grund der unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der Proteine, die von der spezifischen Eigenladung abhängen.

Die prinzipiell hervorragenden Trenneigenschaften der Methode der Isoelektrofokussierung (Haglund, 1972) werden stark von der Tatsache beeinträchtigt, daß sich bereits aufgetrennte Proteine bei der anschließenden Fraktionierung leicht wieder vermischen können. Die Qualität einer Trennung ist also in erster Linie von der Lösung dieses Problems abhängig.

Die trägerfreie Isoelektrofokussierung nach Macko und Stegemann (1970) ergab bei den Hämolympheproteinen aus Vogelspinnen nach vier Tagen einen Gipfel von 37S-Hämocyanin bei pH 5.1 und einen zweiten Gipfel bei pH 5.5 (Abb. 10), der das Begleitprotein enthielt. Eine verlängerte Fokussierdauer bis zu 14 Tagen verbesserte die Linearität des pH-Gradienten und damit die Trennung der Komponenten, veränderte am Prinzip jedoch nichts.

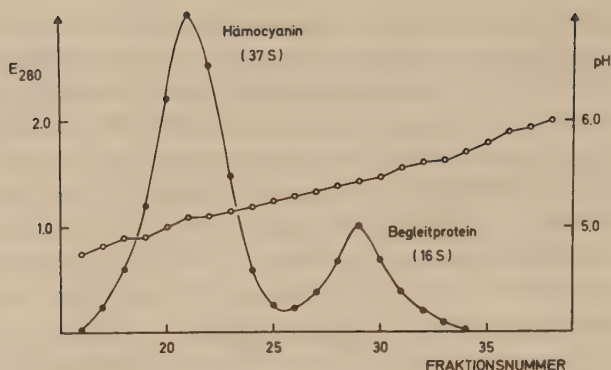


Abb. 10: Extinktionsverlauf bei 280 nm sowie Verlauf des pH-Gradienten in den Fraktionen nach Auftrennung der Hämolympheproteine aus Eurypelma durch trägerfreie Isoelektrofokussierung im Silikonschlauch. 5 mg Protein, 2 % "Ampholine" pH 4-6, Methode nach Macko und Stegemann (1970), 1000 V, 8 Tage, -2°C .

Die Isoelektrofokussierung der Hämolympheproteine aus Cupiennius im Sucrosedichtegradienten (LKB-Säule) führte nach drei Tagen, wie aus Abbildung 11 a ersichtlich, zu einem unbefriedigenden Trennergebnis mit einem Doppelgipfel bei pH 4.8 und 5.2 sowie einer Schulter im alkalischeren Bereich. Die trägerfreie Fokussierung nach Macko und Stegemann (1970) ergab nach vier Tagen ein ähnliches, aber besser gegliedertes Bild (Abb. 11 b), wobei der Gipfel bei pH 4.8 zugunsten der "pH 5.2-Komponente" abgenommen hatte. Die Schulter zum alkalischen Bereich hin war hier ausgeprägter. Dieser Bereich des Elutionsprofils enthielt das Begleitprotein. Die beiden Hauptgipfel dagegen stellten 16S-Hämocyanin dar. 24S-Hämocyanin war offenbar quantitativ dissoziiert. Wurde die trägerfreie Fokussierung von Hämolymphe aus Cupiennius über mindestens eine Woche hinweg durchgeführt, so war, wie Abbildung 11 c zeigt, der Hämocyaningipfel bei pH 4.8 ganz zugunsten des Maximums bei pH 5.2 verschwunden; anstelle der Schulter hatte sich ein deutliches neues Maximum im pH-Bereich 5.5 gebildet, welches das Begleitprotein enthielt.

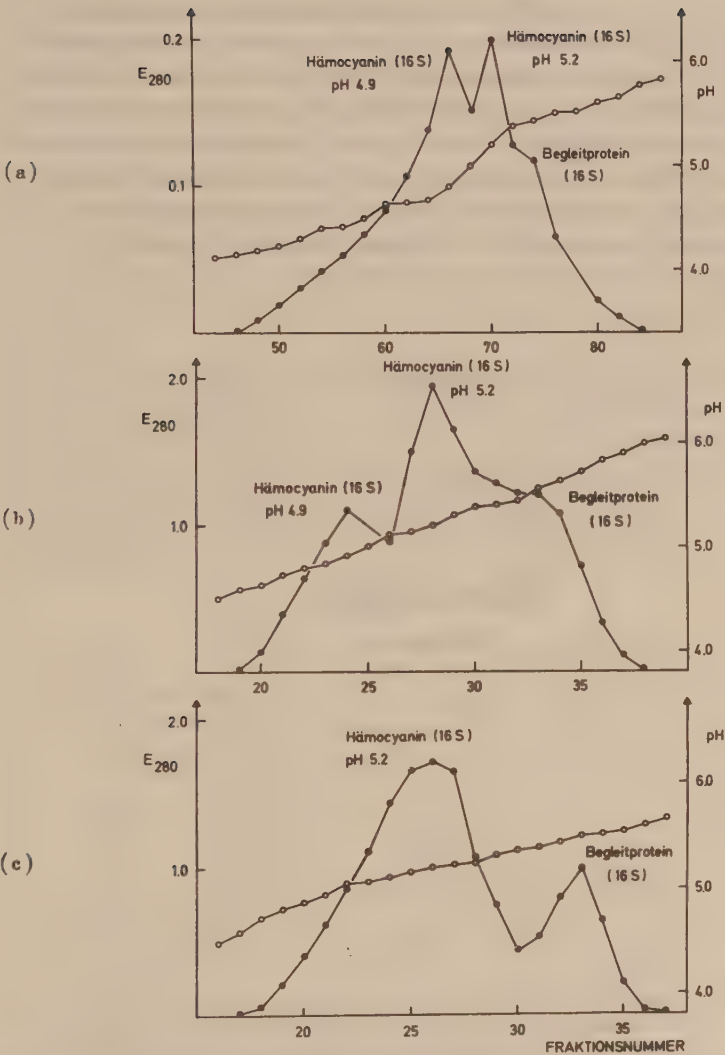


Abb. 11: Verlauf der Extinktion bei 280 nm und des pH-Gradienten in den Fraktionen nach Trennung der Hämolympheproteine aus Cupiennius durch Isoelektrofokussierung (IEF).
 (a) IEF im Sucrosedichtegradienten; 3 mg Protein, +2°C, 0.2 % Ampholine pH 4-6, 1000 V, 3 Tage.
 (b) IEF nach Macko und Stegemann (1970); 5 mg Protein, -2°C, 2 % Ampholine pH 4-6, 1000 V, 4 Tage.
 (c) Wie (b), jedoch 8 Tage.

Ein Nachteil der bisher beschriebenen Fokussierungsmethoden ist die lange Versuchsdauer. Wesentlich kürzere Versuchszeiten bei noch besserer Trennung benötigte die Isoelektrofokussierung in Sephadex G 75-Platten als Trägermedium (Methode von Radola, 1975). Nach 15 Stunden wurde mit Hämolymphe aus Vogelspinnen ein mit den bisherigen Ergebnissen übereinstimmendes Fleckmuster erhalten (vergl. Abb. 12). Versuche mit Cupiennius-Hämolymphe wurden mit dieser Methode nicht durchgeführt.

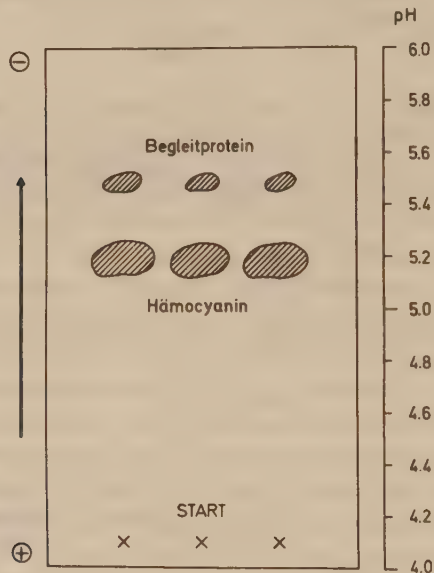


Abb. 12: Abklatsch auf Chromatographiepapier sowie Verlauf des pH-Gradienten nach Auftrennung der Hämolympheproteine aus *Dugesia* in einer Sephadex G 75-Platte. 5 mg Protein, 2 % Ampholine pH 4-6, Methode nach Radola (1975), +2°C, 1200 V, 15 Stunden.

d) Präparative Disc-Elektrophorese: Mit Hilfe der bisherigen Verfahren war es noch nicht möglich, reines Begleitprotein aus Cupiennius zu isolieren. Auch die Begleitproteinfraktionen der Isoelektrofokussierung von Hämolympheprotein aus Cupiennius nach Macko und Stegemann (1970) waren durch die zu unscharfe Trennung der Gipfel (Abb. 11c) stets mit Hämocyanin verunreinigt. Die Isolierung reinen Begleitproteins aus Cupiennius war aber von Bedeutung zur Untermauerung oder Widerlegung der von Czichos-Tiedt (1975) vertretenen Auffassung, das Begleitprotein von Cupiennius sei heterogen und enthielte ein zweites 16S-Hämocyanin.

Die Auftrennung der drei Proteinkomponenten in der Hämolymphe aus Cupiennius gelang vermittels präparativer Disc-Elektrophorese (Abb. 13). Der mittlere Gipfel besaß kein Absorptionsmaximum bei 340 nm und enthielt, wie SDS-Acrylamidelektrophorese und Kupferanalyse (vergl. C.3.) zeigten, reines Begleitprotein ohne Spuren einer Hämocyaninkomponente.

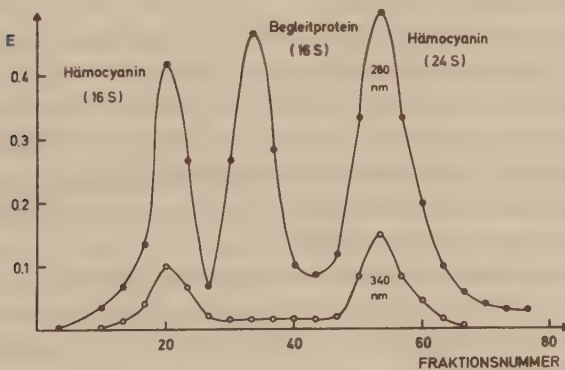


Abb. 13: Extinktionsverlauf bei 280 und 340 nm in den Fraktionen nach Auftrennung der Hämolympheproteine aus Cupiennius durch präparative Disc-Elektrophorese. 15 mg Protein, 5-proz. Gel, Gellänge 3 cm, System 6 aus Maurer (1968), +2°C, 30 mA, 12 Stunden.

3. Chemische Untersuchung der isolierten Hämocyanine und Begleitproteine

a) Kupferanalyse: Eine quantitative Analyse des proteingebundenen Kupfers war für den Vergleich zwischen Hämocyanin und Begleitprotein von Interesse; darüberhinaus sollte sie die Abschätzung des Molekulargewichts der kleinsten funktionellen Hämocyanin-Einheit nach folgender Formel ermöglichen:

$$\text{MG} = \frac{2 \times 63.5 \times 100}{\% \text{ Cu}}$$

Diese Beziehung gilt jedoch nur unter zwei Voraussetzungen:

- (1) Das aktive Zentrum enthält zwei Kupferatome.
- (2) Es gibt im Hämocyaninmolekül keine kupferfreien Polypeptidketten.

Roche (1934) untersuchte eine Reihe von Hämocyaninen auf ihren Kupfergehalt und fand 0.24-0.25 % bei Mollusken (MG ca. 50000 Dalton/ 2 Cu) sowie 0.17-0.18 % bei Arthropoden (MG ca. 75000 Dalton/ 2 Cu). Loewe (1972) führte colorimetrische Cu-Bestimmungen an Spinnenhämolymphe durch, doch waren die Begleitproteine nicht abgetrennt.

Bei eigenen Untersuchungen an isolierten Reinkomponenten mit Hilfe von flammenloser Atomabsorption ergaben sich bei den Hämocyaninen unterschiedliche, stark von der jeweiligen präparativen Methode abhängige Kupferwerte. Sie lagen zwischen 0.14 und 0.17 %. Offenbar ging bei der Präparation ein wechselnder Kupferanteil verloren. Die Begleitproteine hingegen erwiesen sich stets als kupferfrei.

Dies bot andererseits die Möglichkeit, durch Bestimmungen am Gesamtprotein der Hämolymphe und Berücksichtigung des Begleitproteinanteils den Kupfergehalt der Hämocyanine auf indirektem Weg genauer zu ermitteln. Cupiennius-Hämolympheprotein ergab im Durchschnitt 0.130 % Kupfer (Loewe, 1972 : 0.12 %). Da der Anteil des Begleitproteins ziemlich genau 25 % beträgt, ergeben sich für das Hämocyanin aus Cupiennius 0.173 % Kupfer. Bei Dugesia ist der Anteil des Begleitproteins 20 %, der Kupfergehalt des Gesamtproteins 0.140 % (Loewe, 1972 : 0.18 %); die analoge Rechnung führt zu 0.175 % Kupfer für das Hämocyanin aus Dugesia. Für das aus Eurypelma wurde ein identischer Wert ermittelt.

Umgekehrt errechnen sich aus den prozentualen Kupferwerten für die kleinste funktionelle Untereinheit des Hämocyanins Molekulargewichte von 74000 Dalton bei Cupiennius und 73000 Dalton bei den Vogelspinnen. Diese Werte stimmen mit denen durch SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese für die Hämocyanin-Polypeptidketten ermittelten gut überein (vergl. Tab. 1, S. 18).

b) Eisenanalyse: Czichos-Tiedt (1975) hatte die Hämolympheproteine von Cupiennius durch Anfärbung im Gel nach Manwell und Baker (1963) auf Peroxidaseaktivität untersucht und bei allen drei Proteinen eine positive Reaktion gefunden. Peroxidaseaktivität ist jedoch nicht nur für die kupferhaltigen Hämocyanine charakteristisch, sondern auch für eine Reihe anderer, zumeist eisenhaltiger Proteine wie z.B. Katalase.

Ein Eisengehalt beim Begleitprotein hätte vermittels der flammenlosen Atomabsorption eine arbeitstechnisch einfache Routinemethode zur Unterscheidung vom Hämocyanin ermöglicht. Die Begleitproteine der drei Spinnenarten erwiesen sich jedoch ebenso wie die Hämocyanine als frei von Eisen.

Die analytische Brauchbarkeit der Färbung nach Manwell und Baker (1963) erweist sich damit als gering. Es ist nicht klar, worauf die positive Reaktion des Begleitproteins zurückzuführen ist, nachdem es sich sowohl als kupferfrei, als auch als eisenfrei erwiesen hat.

c) Aminosäureanalyse: Bisher haben sich schon eine Reihe von Autoren mit der Aminosäurezusammensetzung von Hämocyaninen beschäftigt. Ghiretti-Magaldi et al. (1966) veröffentlichten Aminosäureanalysen der Hämocyanine aus zehn verschiedenen Mollusken und Arthropoden. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Arbeiten über dieses Thema bis 1967 gibt Ghiretti (1968). Neuere Untersuchungen an Molluskenhämocyaninen stammen z.B. von Witters und Lontie (1968), Dijk et al. (1970), sowie Waxman (1975), an Arthropodenhämocyaninen z.B. von Carpenter und van Holde (1973) und wiederum von Waxman (1975). Bei Spinnenhämocyaninen fehlten solche Untersuchungen bisher. Hämocyanine und Begleitproteine der drei Spinnenarten wurden nach mehreren Methoden isoliert (vergl. C.2.), gegen 0.01 M Phosphatpuffer dialysiert und unter Stickstoffatmosphäre

einer Hydrolyse mit 6 N Salzsäure bei 110°C unterzogen. Die Ergebnisse der anschließenden automatischen Analyse wurden einmal mit Hilfe der bei einem Eichgemisch erhaltenen Werte korrigiert, zum anderen wurde für mehrere Aminosäuren auf Grund der Ergebnisse bei unterschiedlichen Hydrolysezeiten (24, 48 und 96 Stunden) auf den Hydrolysezeitpunkt Null (Threonin, Serin, Tyrosin) bzw. Unendlich (Valin, Isoleucin) extrapoliert.

Tabelle 2: Ergebnisse der automatischen Aminosäureanalyse der drei Spinnenhämocyanine. Die Werte für Methionin und Tryptophan wurden separat durch andere Methoden bestimmt (siehe Text). Bezüglich Valin, Isoleucin, Threonin, Serin und Tyrosin wurde auf den Hydrolysezeitpunkt Null bzw. Unendlich extrapoliert. Die Angaben in Mol-% finden sich in Tabelle 3 . Siehe auch das Blockdiagramm in Abb. 14.

AS	Resteverhältnisse in Gramm-%			Resteverhältnisse in AS pro Polypeptidkette (72 000 Dalton)		
	Cup	Dug	Eury	Cup	Dug	Eury
Lys	5.8	5.7	5.6	32.5	31.8	31.5
His	4.2	5.4	5.3	22.0	28.1	27.9
Asp	13.8	14.0	14.3	86.5	87.8	89.3
Thr	4.7	4.3	4.4	33.7	30.8	31.7
Ser	4.6	4.2	4.5	37.7	34.5	36.8
Glu	13.4	11.5	11.1	74.7	64.3	62.1
Pro	4.3	5.2	5.3	31.8	38.4	39.0
Arg	5.7	7.8	7.9	26.4	36.0	36.4
Gly	4.0	2.9	3.0	50.9	36.7	37.7
Ala	5.2	3.6	3.6	53.2	36.5	36.6
Val	4.9	5.4	5.2	35.3	39.3	37.9
Cys	1.6	1.3	1.4	10.9	9.2	9.7
Met	2.1	2.2	2.1	11.8	12.3	11.7
Ile	3.9	3.8	3.7	24.7	24.0	23.4
Leu	8.4	7.7	7.7	53.5	49.1	49.3
Tyr	5.5	6.7	6.5	24.1	29.5	28.8
Phe	5.3	5.6	5.7	25.8	27.6	27.3
Trp	2.8	2.8	2.9	10.7	10.8	11.0
NH ₃	3.3	1.5	1.6	146.3	69.2	72.0

Da Tryptophan im Verlauf der sauren Hydrolyse zerstört wird, mußte es gesondert bestimmt werden. Dies geschah vermittlels des spektralphotometrischen UV-Tests von Bencze und Schmid (1957).

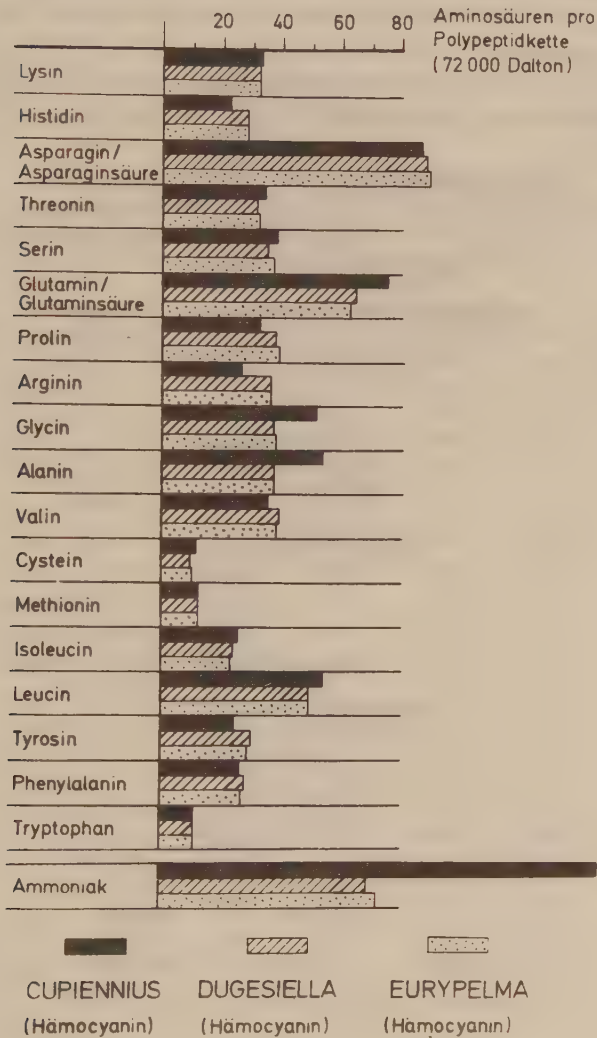


Abb. 14: Aminosäurezusammensetzung der drei Spinnenhämocyanine, ausgedrückt in Aminosäurereste pro Polypeptidkette (72000 Dalton). Siehe auch Tabelle 2.

Angesichts der besonderen Bedeutung der Zahl der Methioninreste für die proteolytische Spaltung mit Bromcyan (vergl. C.4.) wurde der Methioningehalt der Hämocyanine colorimetrisch nachbestimmt (Methode von Bolling, 1951). Die so erhaltenen Werte lagen bei 12 Methioninresten pro Polypeptidkette, während die automatische Analyse nur 10 Reste ergab. In den Tabellen 2 und 3 sowie in den Abbildungen 14 und 15 sind die Methioninwerte aus den Bestimmungen nach Bolling (1951) aufgeführt.

Tabelle 3: Aminosäurezusammensetzung der Hämocyanine und Begleitproteine der drei Spinnenarten, ausgedrückt in Mol-%. Vergleiche auch Tabelle 2 sowie Abb. 15.

AS	Hämocyanin			Begleitprotein		
	Cup	Dug	Eury	Cup	Dug	Eury
Lys	5.0	5.1	5.0	4.6	4.4	4.4
His	3.4	4.5	4.4	2.3	3.6	3.5
Asp	13.4	14.0	14.2	11.9	13.0	12.8
Thr	5.2	4.9	5.0	5.5	5.1	5.2
Ser	5.8	5.5	5.9	8.6	7.7	7.5
Glu	11.6	10.3	9.9	11.0	9.5	9.9
Pro	4.9	6.1	6.2	7.9	6.5	6.5
Arg	4.1	5.7	5.8	3.4	5.8	5.6
Gly	7.9	5.9	6.0	6.2	5.6	5.6
Ala	8.2	5.8	5.8	5.8	6.0	5.9
Val	5.5	6.3	6.0	7.0	6.8	6.8
Cys	1.7	1.5	1.5	1.5	1.4	1.4
Met	1.8	2.0	2.0	1.9	1.8	1.8
Ile	3.8	3.8	3.7	5.0	4.2	4.4
Leu	8.3	7.8	7.9	7.4	6.8	6.7
Tyr	3.7	4.7	4.6	3.6	4.8	4.8
Phe	4.0	4.4	4.3	4.7	5.6	5.7
Trp	1.7	1.7	1.8	1.7	1.5	1.5

Die Ergebnisse der Aminosäureanalyse der drei Hämocyanine sind in Tabelle 2, die der drei Begleitproteine im Vergleich mit den Hämocyaninen in Tabelle 3 zusammengefaßt.

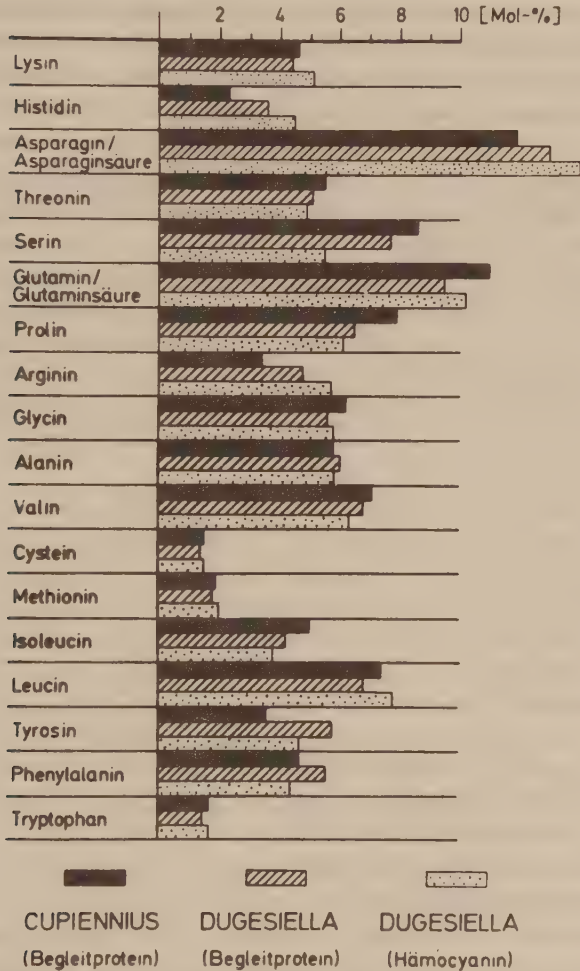


Abb. 15: Aminosäurezusammensetzung der Begleitproteine aus Cupiennius und Dugesia sowie des Hämocyanins aus Dugesia, ausgedrückt in Mol-%. Siehe auch Tab. 3.

Die Vogelspinnenhämocyanine erwiesen sich als innerhalb der Fehlergrenzen identisch, sind jedoch vom Hämocyanin aus *Cupiennius* bezüglich einer Reihe von Aminosäuren signifikant verschieden. Die Unterschiede sind bei His, Pro, Arg, Gly, Ala und Tyr besonders deutlich (vergl. Abb. 14). Bei *Dugesia* (*Eurypelma*) ergeben sich 35.7 % (35.6) aliphatische und aliphatisch-cyclische Aminosäuren (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro), 15.3 % (15.2) basische (Arg, Lys, His), 24.3 % (24.1) saure und ihre Amide (Asp, Glu, Asn, Gln), 10.8 % (10.7) aromatische (Phe, Tyr, Trp), sowie 10.4 % (10.9) mit Hydroxyl-Gruppen (Ser, Thr) und 3.5 % (3.5) schwefelhaltige (Cys, Met). Beim Hämocyanin aus *Cupiennius* sind 38.6 % aliphatische, 12.5 % basische, 25.0 % saure (und ihre Amide), 9.4 % aromatische, 11.0 % hydroxylhaltige und 3.5 % schwefelhaltige Aminosäuren vorhanden. Die Differenz zwischen sauren und basischen Gruppen beträgt bei den Vogelspinnen ca. 9 %, bei *Cupiennius* dagegen ca. 12 %. Der höhere Prozentsatz saurer Gruppen bei *Cupiennius* wird jedoch offenbar durch eine weitergehende Aminierung ausgeglichen, wie aus der Bestimmung des Ammoniakgehalts hervorgeht (vergl. Abb. 14).

Die geringe Zahl der Cysteinmoleküle im Hämocyanin kann als Indiz gelten in der Diskussion, ob die Bindung der beiden Kupferatome im aktiven Zentrum, für die nach den Befunden von Salvato et al. (1974) acht Aminosäuren als Liganden notwendig sind, über Cystein (Klotz und Klotz, 1955) oder Histidin (Lontie, 1958) erfolgt. In der Polypeptidkette des Hämocyanins aus *Dugesia* zum Beispiel stehen einerseits 9 Cysteinreste, andererseits 28 Histidinreste zur Verfügung. Die Wahrscheinlichkeit einer in der Tertiärstruktur gegenüberliegenden Position von je vier kupferbindenden Aminosäuren und damit einer Beteiligung am aktiven Zentrum wäre also von der Aminosäurezusammensetzung her beim Histidin viel höher als beim Cystein.

Die beiden gängigsten Methoden zur Zerlegung von Proteinen in kleinere Peptide sind die Bromcianspaltung (spezifische Proteolyse beim Methionin) und die Trypsinspaltung (spezifische Proteolyse bei Lysin und Arginin). Auf Grund der Aminosäurezusammensetzung der Spinnenhämocyanine sind bis zu 13 Bromcyanbruchstücke bzw. 60-70 tryptische Spaltprodukte zu erwarten.

Die Begleitproteine aus den Hämolymphe der beiden Vogelspinnenarten sind nahezu identisch und unterscheiden sich von dem aus *Cupiennius* signifikant in einer Reihe von Aminosäuren (vergl. Tabelle 3). Aus Abbildung 15 sowie aus Tabelle 3 geht weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen Hämocyanin und Begleitprotein aus Vogelspinnen hervor. Bei *Cupiennius* sind die Unterschiede zwischen Hämocyanin und Begleitprotein noch deutlicher (vergl. Tabelle 3), besonders was die Aminosäuren Histidin, Serin, Prolin, Alanin und Valin betrifft.

d) Kohlenhydratanalyse: Dijk et al. (1970) fanden bei Hämocyanin aus *Helix p.* (*Gastropoda*) 6 % proteingebundene Kohlenhydrate, die sich aus Glucose, Galaktose, Mannose, Xylose, Fucose, Glucosamin und Galaktosamin zusammensetzten. Hämocyanin aus *Octopus v.* (*Cephalopoda*) hingegen besitzt nur 4 % Kohlenhydrat, bestehend aus Mannose, Fucose und Glucosamin (Albergoni et al., 1972). Die bisher darauf untersuchten Arthropodenhämocyanine weisen demgegenüber nur einen Neutralzuckeranteil von 1 % oder weniger auf, wie z.B. Loehr und Mason (1973) bei *Cancer m.* (*Crustacea*) und Loewe et al. (1970) bei *Cupiennius* feststellten. Waxman (1975) bestimmte 0.7 % Kohlenhydrat (Mannose und Glucosamin) bei Hämocyanin aus *Homarus a.* (*Crustacea*) und 3.5 % (Mannose und Glucosamin) bei Hämocyanin aus *Busycon c.* (*Gastropoda*). Demgegenüber fand Ghiretti (pers. Mitteilung) weder bei Hämocyanin aus *Limulus p.* (*Xiphosura*) noch aus *Carcinus m.* (*Crustacea*) eine Kohlenhydratkomponente.

In der Hämolymphe der drei Spinnenarten wurden zunächst freie Zucker analysiert. Die enzymatische Bestimmung des Gehalts an freier Glucose ergab im Mittel 0.32 mg/ml bei *Cupiennius*, 0.16 mg/ml bei *Eurypelma* und 0.11 mg/ml bei *Dugesiella* (12 bzw. 5 bzw. 4 untersuchte Tiere). Die Werte waren starken Schwankungen unterworfen. Zur Bestimmung weiterer freier Zucker wurden die Hämolympheproteine mit 20 % TCA ausgefällt, der Überstand über Mischbettionenaustauscher gereinigt und das eingeengte Eluat einer Dünnschichtchromatographie unterzogen (Abb. 16: " frei "). Es zeigten sich in der Hämolymphe der Spinnen neben Glucose keine weiteren freien Neutralzucker.

Zur Bestimmung proteingebundener Neutralzucker wurde isoliertes Hämocyanin bzw. Begleitprotein zunächst ausgiebig gegen 0.1 M KCl-Lösung und dann gegen Wasser dialysiert.

Der colorimetrische Test mit Anthron-Reagens (Roe, 1955), direkt am unhydrolysierten Hämocyanin durchgeführt, ergab einen Gesamt-Neutralzuckeranteil von 0.8 %, doch war bei diesem Vorgehen keine quantitative Ausbeute zu erwarten. Immerhin wurden die Befunde von Loewe et al. (1970) bestätigt: Spinnen-hämocyanine sind Glycoproteide. Zur genaueren Untersuchung wurden die Neutralzucker unter wechselnden Bedingungen durch schwefelsaure Hydrolyse freigesetzt, anschließend über Mischbett-Ionenaustauscher gereinigt und dann der Anthron-Reaktion einerseits und der Dünnschichtchromatographie andererseits unterzogen. Mit der Anthron-Reaktion ergaben sich bei den drei Hämocyaninen auf diese Weise 1.4 % proteingebundene Neutralzucker, was bei einer Polypeptidkette vom Molekulargewicht 72000 Dalton fünf bis sechs Zuckermolekülen (MG je 180 Dalton) entspricht (vergl. Tabelle 4).

Die drei Begleitproteine weisen einen Neutralzuckergehalt von 0.9 % auf.

Zur dünnschichtchromatographischen Identifizierung wurde einerseits eindimensional chromatographiert, wobei zwei verschiedene Laufmittel getrennt zur Anwendung kamen (stets mit Zweifachentwicklung), andererseits wurde auch zweidimensional verfahren (jede Dimension mit Zweifachentwicklung), und zwar unter kombinierter Anwendung beider Laufmittel. Die mit Anilinphthalat besprühten Zucker zeigten im UV-Licht (350 nm) unterschiedliche Färbungen: Braungelb (Hexosen), orange (Methylhexosen) und rot (Pentosen).

Die in Abbildung 16 für *Dugesiella* wiedergegebenen Schemata der dünnschichtchromatographischen Identifizierung der freien, Hämocyanin-gebundenen und Begleitprotein-gebundenen Neutralzucker gelten für alle drei Spinnenarten. Die Neutralzuckerkomponente des Spinnenhämocyanins setzt sich aus Glucose, Mannose, Arabinose und Fucose zusammen, wobei die Glucosemenge, gemessen an der Fleckengröße, in etwa der Summe der drei anderen Zucker entsprach. Beim Begleitprotein der drei Spinnenarten liegt lediglich Glucose als proteingebundener Neutralzucker vor.

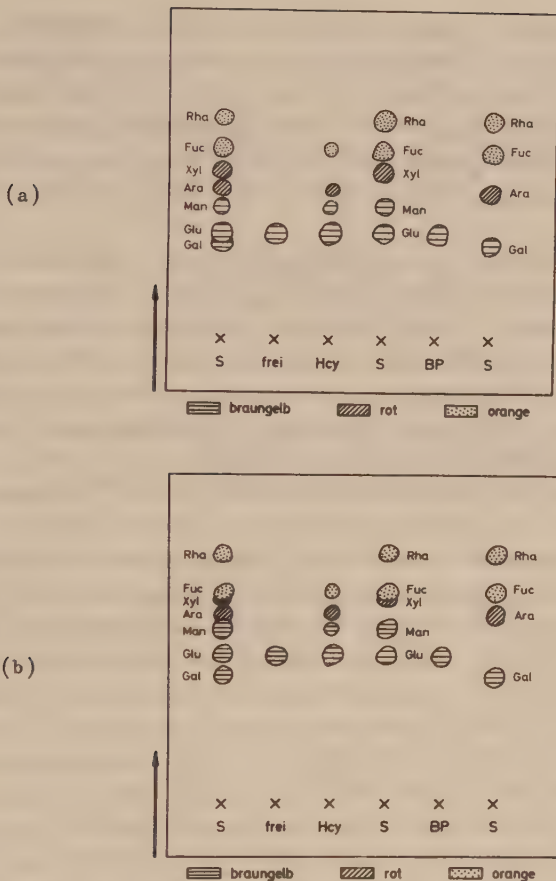


Abb. 16: Identifizierung der Neutralzucker von Hämolymphe aus *Dugesia* durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie; frei = freie Hämolymphezucker
 Hcy = hämocytingebundene Zucker
 BP = begleitproteingebundene Zucker
 S = Standard (je 5 γ Galaktose, Glucose, Mannose, Arabinose, Xylose, Fucose, Rhamnose);
 Cellulosefolien MN 300 (Macherey-Nagel) 20 x 20 cm,
 Zweifachentwicklung, Färbung mit Anilinphthalat (7 Min. bei 105°C).

(a) Laufmittel: t-Butanol/Methyläthylketon/Ameisensäure/Wasser (8 : 6 : 3 : 3) ($\bar{v}$: ∇ : ∇ : ∇).
 Einfache Laufzeit: 2,5 Stunden.

(b) Laufmittel: n-Butanol/Pyridin/0.1 N HCl (5 : 3 : 2) (∇ : ∇ : ∇). Einfache Laufzeit: 4 Stunden.

Um sicherzugehen, daß der als proteingebunden aufgefaßte Glucoseanteil der Hämolympheproteine nicht doch auf verschleppte freie Glucose zurückgeht, wurden dialysierte Hämocyaninproben von Cupiennius vor und nach der Hydrolyse enzymatisch auf Traubenzucker untersucht. Der Test verlief nur nach der Hydrolyse positiv. Dabei wurde ein Glucosewert von 0.7 % ermittelt.

Da die Polypeptidkette der Spinnenhämocyanine einerseits einen Gesamtgehalt von 5-6 Neutralzuckern aufweist (Bestimmung mit Anthron-Reagens), andererseits die Hälfte dieser Zuckermenge durch Glucose repräsentiert wird (Vergleich der Fleckengrößen; enzymatische Bestimmungen), setzt sich die Neutralzuckerkomponente aus 3 Glucose-, 1 Mannose-, 1 Arabinose- und 1 Fucosemolekül zusammen (vergl. Tabelle 4).

Zur Analyse proteingebundener Aminosucker wurden Hämocyaninproben mit 3.5 N Salzsäure hydrolysiert, die Salzsäure im Rotationsverdampfer entfernt und negativ geladene Aminosäuren, Neutralzucker sowie Salzanionen im neutralen Eluat eines Kationenaustauschers abgetrennt. Nach Elution mit Salzsäure wurde versucht, im Eluat mittels Dünnschichtchromatographie Aminosucker nachzuweisen, doch erwiesen sich miteluierte Verunreinigungen (positiv geladene Aminosäuren, Salzkationen) als sehr störend. Um diese Substanzen über Ionenaustauscher abtrennen zu können mußten die vorgereinigten Aminosucker zunächst in elektrisch neutrale Verbindungen überführt werden. Dies geschah nach Stoffyn und Jeanloz (1954) durch Konvertierung der Aminosucker in die korrespondierenden Pentosen mittels Ninhydrin. Glucosamin wird auf diese Weise in Arabinose konvertiert (Abb. 17), Galaktosamin dagegen in Lyxose.

So erhaltene Pentosen konnten über Mischbett-Ionenaustauscher gereinigt und colorimetrisch quantitativ bestimmt sowie dünn-schichtchromatographisch identifiziert werden. Es fand sich bei allen drei Hämocyaninen als einziger proteingebundener Aminosucker Glucosamin (vergl. Abb. 18), und zwar 0.4 %, was 1-2 Aminosuckermolekülen pro Polypeptidkette entspricht (Tabelle 4).

Analoge Untersuchungen an den Begleitproteinen fanden nicht statt.

GLUCOSAMIN

ARABINOSE

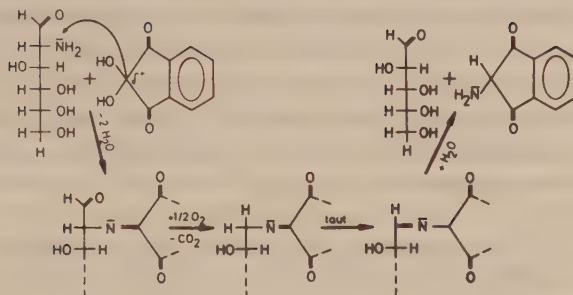


Abb. 17: Schema der Ninhydrinreaktion, in deren Verlauf Aminosucker (Glucosamin) in ihre korrespondierenden Pentosen (Arabinose) konvertiert werden.

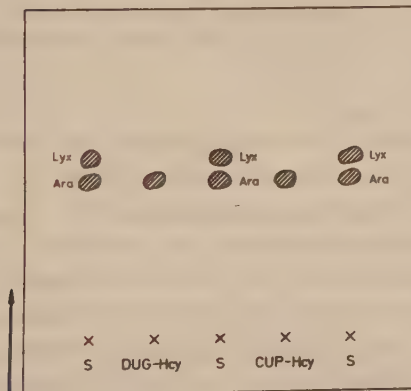


Abb. 18: Identifizierung der hämocyaneingebundenen Aminosucker von Dugesella ("Dug-Hcy") und Cupiennius ("Cup-Hcy") durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie nach Konvertierung in die korrespondierenden Pentosen (Arabinose $\hat{=}$ Glucosamin, Lyxose $\hat{=}$ Galaktosamin); S = Standard (je 5 γ Arabinose und Lyxose); Cellulosefolien MN 300 (Macherey-Nagel); Laufmittel: t-Butanol/Methyläthylketon/Ameisensäure/Wasser (8:6:3:3) (v:v:v:v); Zweifachentwicklung; einfache Laufzeit: 2.5 Stunden; Färbereagens: Anilinphthalat.

Zur Analyse von Neuraminsäuren wurden die Hämocyane ent-
sprechend dem colorimetrischen Test von Svennerholm (1957)
direkt mit Resorcin-Reagens umgesetzt. Das Ergebnis war je-
doch bei allen drei Spinnenarten negativ. Nach diesen Befunden
sind an der Kohlenhydratkomponente der Spinnenhämocyane
keine Neuraminsäuren beteiligt. Die Begleitproteine wurden
nicht auf Neuraminsäuren untersucht.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Kohlenhydratkomponente des
Hämocyanins aus Spinnen. Die Ergebnisse waren bei
Cupiennius, Dugesia und Eurypelma identisch.

	Gewichts- %	Mengenverhält. (Fleckengröße)	Zuckerreste pro Polypeptidkette
Glucose	0.7 ± 0.1	3	2 - 3
Mannose	-	1	1
Arabinose	-	1	1
Fucose	-	1	1
Glucosamin	0.4 ± 0.1	-	1 - 2
Neutralsucker	1.4 ± 0.1	-	5 - 6
Aminosucker	0.4 ± 0.1	-	1 - 2
Neuraminsäuren	0.0	-	0

e) Analyse der N-terminalen Aminosäure: Die bisherigen Versu-
che zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäure von Hämocyaninen
sind in ihren Ergebnissen stark widersprüchlich. Dijk et al.
(1970) fanden N-terminales Arginin bei Hämocyanin aus *Helix p.*
(Gastropoda), Brouwer und Kuiper (1973) dagegen lediglich
sehr geringe Mengen Isoleucin beim gleichen Hämocyanin. Car-
penter und van Holde (1973) bestimmten bei Hämocyanin aus
Cancer m. (Crustacea) Asparaginsäure als Aminoendgruppe,
desgleichen Kuiper et al. (1975) bei *Panulirus i.*-Hämocyanin
(Crustacea) und Waxman (1975) bei *Octopus*-Hämocyanin (Ce-
phalopoda). Waxman konnte außerdem zeigen, das Hämocyanin
aus *Homarus a.* (Crustacea) eine blockierte Endgruppe besitzt,
deren aufwendige Analyse zu der Endsequenz X-Glu-Asp...
führte. Stewart et al. (1973) fanden N-terminales Arginin bei
Hämocyanin aus *Jasus l.* (Crustacea), weitere Autoren

Beschrieben die N-terminale Endgruppe des von ihnen untersuchten Hämocyanins als blockiert, so z.B. Cox et al. (1972), die an *Helix p.* arbeiteten.

Unter Anwendung der Dansylmethode wurde in eigenen Versuchen zunächst probeweise die N-terminale Aminosäure von Rinderse-rumalbumin (Asparaginsäure) und Subtilisin (Alanin) bestimmt und anschließend versucht, die Endgruppen der drei Hämocyanine und Begleitproteine zu ermitteln. Die Ergebnisse waren jedoch bei allen sechs Proteinen negativ.

Die N-terminalen Endgruppen der untersuchten Hämocyanine und Begleitproteine müssen nach diesen Befunden blockiert sein. Eine starke Stütze für das Vorliegen blockierter Endgruppen lieferte ein Versuch, in welchem gleich große Mengen des Hämocyanins aus *Dugesia* vor und nach der Bromcyan-spaltung analysiert wurden. Während das ungespaltene Hämocyanin keine Endgruppe zeigte, traten im Falle des mit Bromcyan gespaltenen Hämocyanins, analog zu den unter C.4 für alle drei Spinnenarten beschriebenen Ergebnissen, im Dünnschichtchromatogramm fünf deutliche Flecken auf, welche Dansyl-Aminosäuren zugeordnet werden konnten.

Nach der proteolytischen Spaltung der Polypeptidkette sind also freie N-terminale Aminosäuren vorhanden, vorher jedoch nicht. Demzufolge muß die Aminoendgruppe des Spinnenhämocyanins blockiert sein.

4. Bromcyan-spaltung

Waxman (1975) hatte Hämocyanin aus *Homarus a.* (Crustacea) mit Bromcyan in vier Bruchstücke gespalten. Die geringe Zahl der Methioninmoleküle in der Hämocyaninpolypeptidkette der Spinnen (automatische Analyse: 10 Reste; separate Bestimmung: 12 Reste) ließ es als vorteilhaft erscheinen, diese ebenfalls mit Bromcyan zu behandeln, welches spezifisch bei Methionin spaltet. Es sollte festgestellt werden, ob auf diese Weise für eine Sequenzanalyse geeignete Bruchstücke zu erhalten sind.

Spaltungen dieser Art können in 70-proz. Ameisensäure oder in 0.1 N Salzsäure durchgeführt werden. Da eine Reihe von Autoren bei Inkubation des Hämocyanins mit Ameisensäure allein schon

proteolytische Spaltungen festgestellt haben (z.B. Carpenter und van Holde, 1973), wurden entsprechende Vorversuche auch mit den Hämolympheproteinen aus Spinnen durchgeführt. Hierbei erwiesen sich die Begleitproteine als unempfindlich gegenüber der Behandlung mit 70-proz. Ameisensäure bei Raumtemperatur, nicht aber die Hämocyanine. Nach 24 Stunden bei 20°C war, wie die anschließende SDS-Polyacrylamidelektrophorese zeigte, etwa ein Drittel der Hämocyaninmenge in Einheiten gespalten, die kleiner als die Polypeptidkette waren. 80 % dieser Bruchstücke wurden durch eine Bande vom Molekulargewicht 36000 Dalton repräsentiert. Die übrigen 20 % verteilten sich auf zwei weitere Komponenten mit Molekulargewichten von ca. 18000 bzw. 54000 Dalton (Abbildung 19). Die gleichen Spaltprodukte traten bei allen drei Spinnenarten in sehr geringem Umfang (ca. 5 % des Gesamthämocyanins) bereits bei 4°C nach 24-stündiger Inkubation auf. Wie Abbildung 19 außerdem zeigt, wurden bei Inkubation mit 0.1 N Salzsäure bei 4°C über 96 Stunden weder Hämocyanine noch Begleitproteine proteolytisch angegriffen. Die in Abbildung 19 für *Dugesia* wiedergegebenen Bandenmuster gelten für alle drei Spinnenarten.

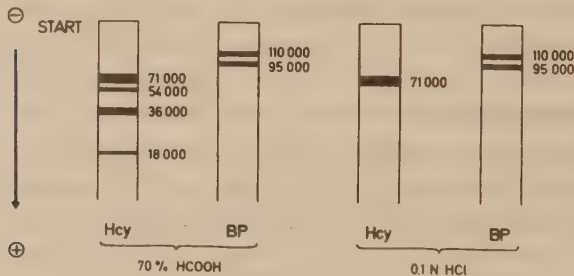


Abb. 19: Polyacrylamid-Elektrophorese des mit 1 % SDS denaturierten, reduzierten (1 % β -Mercaptoäthanol) Hämocyanins sowie Begleitproteins aus *Dugesia* nach Inkubation mit 70-proz. HCOOH (20°C, 24 Std.) bzw. 0.1 N HCl (4°C, 96 Std.). Die Banden sind durch ihre Molekulargewichte charakterisiert. System von Weber und Osborn (1969), 10-proz. Gele, 8 mA/Gel, 6 Stunden.

Auf Grund der Ergebnisse der Vorversuche wurde die Bromcyanspaltung der Hämocyanine zunächst in 0.1 N Salzsäure durchgeführt, doch wurde in der anschließenden SDS-Gelelektrophorese die gesamte Proteinmenge reproduzierbar nur durch eine einzige breite Bande im Molekulargewichtsbereich 24000 Dalton repräsentiert (Abbildung 20).

Dagegen traten bei Durchführung der Bromcyanspaltung in 70-proz. Ameisensäure sowohl bei 4°C als auch bei 20°C gut reproduzierbar (n = 8) sieben Bruchstücke auf (Abbildung 20). Die Spaltung war nach 24 Stunden in jedem Fall quantitativ erfolgt. Eine verlängerte Versuchsdauer von 48 Stunden veränderte das Bild nicht mehr.

Die Bandenmuster waren bei allen drei Spinnenarten im Prinzip gleich, doch wurden nur im Fall von *Dugesia* die Molekulargewichte und die Mengenverhältnisse näher bestimmt.

Hierbei ergab sich einmal, daß die Summe der Molekulargewichte bei 106000 Dalton lag, also weit über dem Molekulargewicht der Polypeptidkette, zum anderen sind die sehr konstant auftretenden Teilchenverhältnisse nicht gleich (Tabelle 5); besonders die in Abbildung 20 mit "B 4" bezeichnete Bande ist erheblich schwächer als z.B. "B 5", welche ein sehr ähnliches Molekulargewicht besitzt.

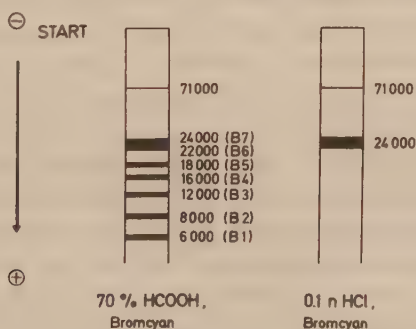


Abb. 20: Polyacrylamid-Elektrophorese des Hämocyanins aus *Dugesia* nach Inkubation mit 0.5 % Bromcyan; sonstige Versuchsbedingungen wie in Abbildung 19. Die Banden sind durch ihre MG charakterisiert; die Bruchstücke wurden mit B1 bis B7 bezeichnet. Die Position der ungespaltenen Polypeptidkette ist in der oberen Gelhälfte angedeutet.

Tabelle 5: Ergebnisse der Bromcyanspaltung des Hämocyansins aus Dugesia in 70-proz. Ameisensäure. Die Teilchenverhältnisse wurden aus den durch Scannen der Gele ermittelten Mengenverhältnissen und den MG berechnet. Die Bruchstücke B7/B6 sowie B5/B4 konnten durch den Scanner nicht getrennt werden; hier sind geschätzte Teilchenverhältnisse in Klammern aufgeführt. Die Prozentangaben sind auf Vielfache von 5.0 auf- bzw. abgerundet (genaue Werte in Klammern).

Bruchstück	MG (Dalton)	Mengenverhält. in %	Teilchenverhält. in %
B 7	24 000	30 (32.1)	(10) (21.4)
B 6	22 000		(10)
B 5	18 000	25 (27.1)	(15) (19.2)
B 4	16 000		(5)
B 3	12 000	20 (18.2)	20 (20.2)
B 2	8 000	15 (13.8)	20 (17.8)
B 1	6 000	10 (8.8)	20 (20.9)

Zur näheren Charakterisierung wurde das Gemisch der Produkte der Ameisensäurespaltung (Abb. 19) einerseits und der Bromcyanspaltung (Abb. 20) andererseits einer N-terminal-Analyse nach der Dansyl-Methode unterzogen. Die Auftrennung der dansylierten Endgruppen erfolgte durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie, wobei 4 verschiedene Laufmittel zur Anwendung kamen. Laufmittel I wurde für die 1. Dimension, die Mittel II, III und IV nacheinander für die 2. Dimension verwendet.

Die Produkte der Ameisensäurespaltung der Hämocyanine zeigten merkwürdigerweise keine N-terminalen Endgruppen.

Im Gegensatz dazu konnten bei den Bromcyanspaltprodukten der Vogelspinnenhämocyanine fünf endständige Aminosäuren identifiziert werden (Abbildung 21): Isoleucin, Leucin, Valin, Glycin und Asparaginsäure. Der Isoleucinfleck war von vergleichsweise doppelter Intensität; diese Endgruppe kommt offenbar zwei Bruchstücken zu. Der Glycin-Fleck war dagegen relativ schwach und ist daher möglicherweise dem Bruchstück B4 zuzuordnen.

Im Fall des Hämocyansins aus Cupiennius wurden nach Bromcyanspaltung die gleichen endständigen Aminosäuren erhalten mit einer Ausnahme: Valin war hier durch Prolin ersetzt.

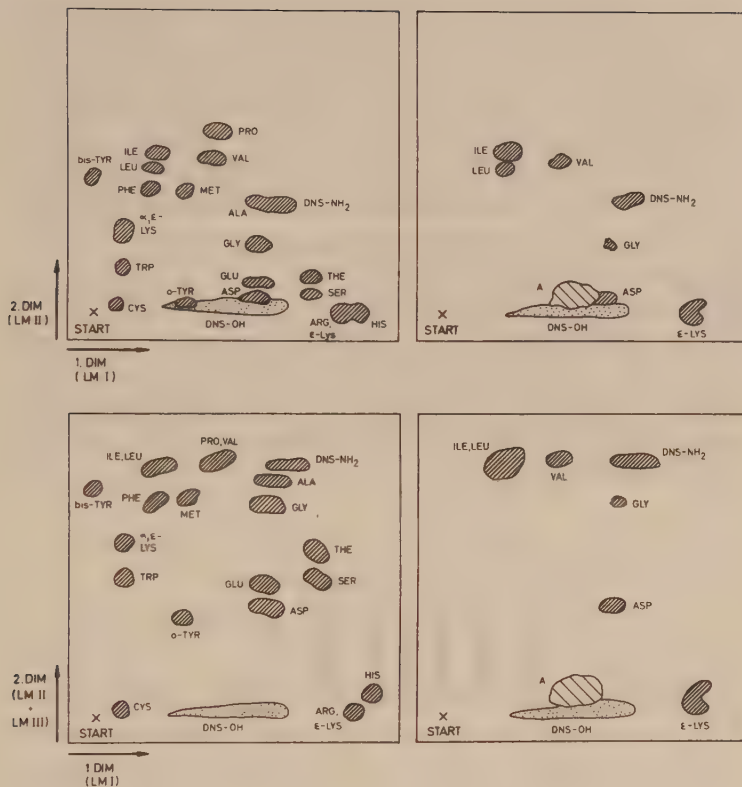


Abb. 21: Identifizierung der N-terminalen Aminosäuren der Bromcyanbruchstücke aus Dugesia-Hämocyanin (rechte Seite) durch zweidimensionale DC vermittelte Referenzchromatogrammen (linke Seite). Artefakte: DNS-OH (Dansylsäure), DNS-NH₂ (Dansylamin), " A " (Natur unbekannt), ε-Lysin (täuscht Arginin und Histidin vor); ε-Lys, Arg und His wurden durch ein weiteres Laufmittel (0.05 M Natriumphosphat in 25 % Äthanol) unterschieden (ohne Abbildung). Methode von Hartley (1970); Polyamid-6-Folien (MN), 20 x 20 cm, Einfachentwicklung, Auswertung: UV-Licht.
 Laufmittel I : 1.5 % Ameisensäure in Wasser;
 Laufmittel II : Benzol/Essigsäure, 9 : 1;
 Laufmittel III: Essigsäureäthylester/Essigsäure/Methanol, 20 : 1 : 1 .
 Beachte rechts: Ile liegt in größerer, Gly in geringerer Menge vor als Leu, Val und Asp.

Nach Bromcyanspaltung und Reinigung im Rotationsverdampfer gehen die Bruchstücke des Spinnenhämocyanins sowohl in SDS-haltigen Pufferlösungen als auch (langsamer) in 1 N Essigsäure wieder in Lösung. Während jedoch in SDS-Polyacrylamidgelen ohne weiteres eine Auftrennung gelang (vergl. Abb. 20), kam es in Essigsäure offenbar zu Aggregationen. Bei Gelfiltration über Biogel P 10 (obere Ausschußgrenze: 20000 Dalton) wurde das gesamte Protein mit der Front erhalten; die einzelnen Moleküle waren demnach größer als 20000 Dalton.

Auf Grund der guten Auftrennbarkeit der Bruchstücke in SDS-Polyacrylamidgelen wurde die präparative Isolierung nach dieser Methode versucht. Beim gespaltenen Hämocyanin aus *Dugesia* wurde hierbei ein 5-gipfliges Elutionsprofil erhalten; den einzelnen Gipfeln konnten bestimmte Bruchstücke zugeordnet werden (Abbildung 22).

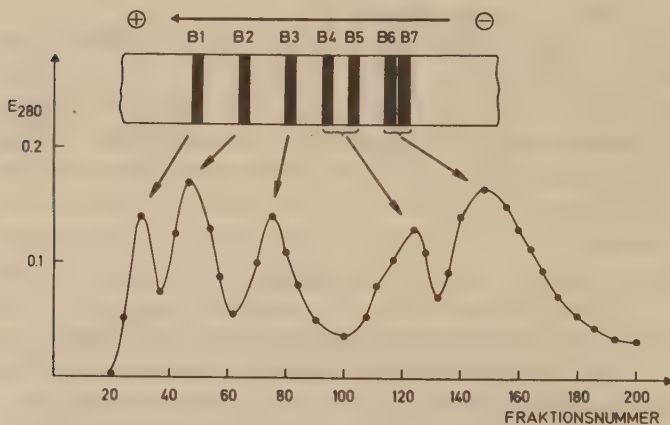


Abb. 22: Extinktionsverlauf bei 280 nm in den Fraktionen nach Auftrennung der Bromcyanbruchstücke aus *Dugesia*-Hämocyanin durch präparative Polyacrylamid-Elektrophorese. Die Bruchstücke waren mit 1 % SDS denaturiert und mit 1 % β -Mercaptoäthanol reduziert. 15 mg Protein, 12-proz. Gel, Gellänge 6 cm, System von Loehr und Mason (1973), 240 Volt, 24 Stunden, +2°C. Zur Verdeutlichung der Bandenzuordnung ist oben die Auftrennung der Bruchstücke im analytischen Gel wiedergegeben.

Allerdings war die Trennung noch nicht scharf genug, da nur wenige Fraktionen eine völlig saubere Bande enthielten.

Immerhin zeigte dieser Vorversuch, daß durch präparative SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese nach einigen methodischen Verbesserungen die Reinisolierung zumindest eines Teils der Bromcyanbruchstücke des Spinnenhäemocyanins durchaus möglich sein dürfte.

Da eine umfassende Untersuchung der Begleitproteine nicht Ziel dieser Arbeit war, wurden nur wenige Versuche zu ihrer Bromcyanspaltung unternommen, so daß diesbezüglich keine gesicherten Befunde vorliegen. Doch unterscheidet sich sowohl das Bandenmuster nach SDS-Gelelektrophorese als auch das Ergebnis der Endgruppenanalyse des Spaltproduktgemischs (sicher identifiziert: Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Alanin) deutlich von den entsprechenden Ergebnissen bei den Häemocyaninen.

D. DISKUSSION

1. Die kleinste strukturelle Untereinheit der Häemocyanine

Die übereinstimmenden Ergebnisse der Denaturierungsversuche am Häemocyanin aus Spinnen mit ganz verschiedenartigen Agenzien (s.S. 15) lassen es als sicher erscheinen, daß auch bei diesen Arthropodenhäemocyaninen ohne Spaltung kovalenter Bindungen ein Molekulargewicht von ca. 70000 Dalton nicht unterschritten werden kann. Dies rechtfertigt, die 5S-Einheit als eine Polypeptidkette aufzufassen.

Der Molekulargewichtsunterschied zwischen Dugesiella-Häemocyanin (71000 Dalton) und Eurypelma-Häemocyanin (74000 Dalton) ist gut reproduzierbar, jedoch nicht ganz einleuchtend, da sich beide Häemocyanine bei allen übrigen Untersuchungen völlig gleich verhielten. Die durch SDS-Gelelektrophorese ermittelten Molekulargewichte konnte R.Schmid (Diss., in Vorb.) durch Sedimentationsgleichgewichts-Zentrifugation in der analytischen UZ bestätigen.

Vermittels der flammenlosen Atomabsorption wurden zwei Kupferatome pro Polypeptidkette bestimmt (s.S. 30).

Nach Loewe und Linzen (1973) bindet die 5S-Einheit der Spinnenhämocyanine Sauerstoff. Die 5S-Einheit (MG ca. 70000 Dalton) wäre somit gleichzeitig kleinste strukturelle und funktionelle Einheit, eine Auffassung, wie sie die meisten Autoren für Arthropodenhämocyanine vertreten (z.B. Carpenter und van Holde, 1973). Salvato et al. (1972) berichten jedoch von der Darstellung von 25000 Dalton-Einheiten bei Hämocyanin aus *Carcinus maenas* (Crustacea). Sie stellen sich den Aufbau des 5S-Moleküls der Arthropodenhämocyanine aus drei solchen Einheiten vor, wobei zwei je ein Kupferatom binden sollen (" funktionelle Untereinheiten "), eines jedoch nicht (" strukturelle Untereinheit "). Der Hintergrund für diese Auffassung, die im übrigen auch im Arbeitskreis von van Holde einmal geäußert wurde (Ellerton et al., 1970), ist ein Versuch, eine Verbindung im Bauprinzip der Arthropoden- und Molluskenhämocyanine herzustellen, die beiden " funktionellen " 25000 Dalton-Moleküle allein sollen die kleinste funktionelle Einheit des Molluskenhämocyanins (MG 50000 Dalton) aufbauen.

Es ist allerdings nicht ganz einzusehen, weshalb für die Arthropodenhämocyanine eine lediglich " strukturelle " Untereinheit erforderlich sein soll, zumal die Quartärstruktur dieser Moleküle wesentlich einfacher erscheint als die der Molluskenhämocyanine.

Bruchstücke mit einem Molekulargewicht von ca. 25000 Dalton wurden sowohl beim Hämocyanin aus dem Cephalopoden *Octopus vulgaris* (Salvato et al., 1972) als auch der Schnecke *Helix pomatia* (Dijk et al., 1970; Cox et al., 1972) durch Behandlung mit 70 % Ameisensäure bzw. mit Succinyl-Anhydrid erhalten. Offenbar war eine Spaltung kovalenter Bindungen erfolgt, wie andere Autoren (z.B. Carpenter und van Holde, 1973) vermuten. Durch Behandlung mit Succinyl-Anhydrid zerlegten Pickett et al. (1966) das Hämocyanin aus *Homarus americanus* (Crustacea) quantitativ in Polypeptide mit einem Molekulargewicht von ca. 35000 Dalton. Die Inkubation von Hämocyanin aus Spinnen mit 70-proz. Ameisensäure im Verlauf der vorliegenden Arbeit lieferte ähnliche Ergebnisse: 80 % der auftretenden Spaltprodukte wurden durch eine Komponente mit einem Molekulargewicht von ca. 36000 Dalton repräsentiert (s.S. 44).

Bemerkenswert ist, daß auch nach dieser Spaltung genau wie am ungespaltenen Hämocyanin keine N-terminalen Aminosäuren nachgewiesen werden konnten. Dies würde bedeuten, daß die unter Einwirkung von Ameisensäure gespaltene Bindung keine Peptidbindung ist. Sollten sich diese Befunde durch unabhängige Untersuchungen weiter bestätigen, so würde sich für den Aufbau der 5S-Einheit folgende Hypothese anbieten:

Zwei identische oder nicht identische Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von je 36000 Dalton sind über eine kovalente, durch Ameisensäure relativ leicht spaltbare Brücke miteinander verbunden. Hierbei könnten die beiden Ketten gegen-
sinnig zueinander verlaufen, wobei endständig jeweils entweder eine blockierte Aminogruppe oder eine Carboxylgruppe vorläge, entsprechend folgender Abbildung:

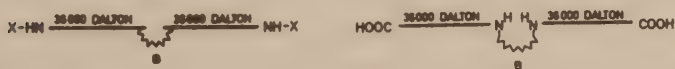


Abb. 23: Hypothetischer Aufbau der kleinsten funktionellen Einheit der Spinnenhämocyanine (siehe Text).
X-HN = blockierte N-terminale Aminosäure.
B = kovalente Brücke unbekannter Art.

Diese Vorstellung hätte den Vorteil einer Symmetriebeziehung zwischen den beiden " Teilketten ", wobei man jeder ein Kupferatom zuordnen könnte. Zur Absicherung einer solchen Vorstellung sind jedoch noch zahlreiche unabhängige Versuche durchzuführen, wobei in erster Linie an Spaltungen mit Succinyl-Anhydrid einerseits und mit verschiedenen proteolytischen Enzymen andererseits zu denken ist.

Nach Bromcyanspaltung des Hämocyanins aus *Homarus americanus* (Crustacea) berechnete Waxman (1975) als Summe der Molekulargewichte der Spaltprodukte 41000 Dalton und schloß daraus, daß die kleinste funktionelle Einheit dieses Hämocyanins aus zwei Ketten gleicher oder sehr ähnlicher Sequenz aufgebaut ist. Bereits Pickett et al. (1966) hatten diese Hypothese vertreten, da sie als Summe der Molekulargewichte der tryptischen Spaltung des Hämocyanins aus *Homarus* 35000 Dalton berechneten.

Kovalente Brücken zwischen Proteinuntereinheiten, wie sie bei Bestätigung der oben genannten Vorstellungen existieren müssen, wurden auch bei der Diskussion des Aufbaus von Molluskenhämocyanin gefordert (z.B. Waxman, 1975). Molluskenhämocyanin zerfällt bei Denaturierung nur bis zu einer Größenordnung von 230-350000 Dalton (z.B. Brouwer und Kuiper, 1973); bereits zur Darstellung der kleinsten funktionellen Einheit müssen hier kovalente Bindungen gespalten werden (z.B. Lontie et al., 1973). Disulfidbrücken scheiden aus, da diese routinemäßig bei Denaturierungsversuchen reduziert werden. Anlässlich eines Hämocyanin-Symposiums in Padua (1974) wurde die Vermutung geäußert, die Brücken könnten von der Kohlenhydratkomponente gebildet werden; eine experimentelle Bestätigung oder Widerlegung steht jedoch noch aus. Hier könnte der Einsatz von Endo-Glycosidasen zur Klärung beitragen.

DiGiamberardino (1965) diskutierte die Möglichkeit einer Heterogenität der 16S- und der 24S-Einheit des Hämocyanins aus *Eriphia spinifrons* (Crustacea). Konings et al. (1969) sowie Siezen und van Driel (1973) stellten durch Sedimentationsläufe in der analytischen UZ fest, daß sich α -Hämocyanin aus *Helix pomatia* (Gastropoda) bei Dissoziationsversuchen nicht einheitlich verhält und schlossen daraus auf eine Heterogenität im Bereich der kleinsten funktionellen Untereinheit, auf eine sogenannte " Mikroheterogenität ".

Ursache könnte die Existenz verschiedener Polypeptidketten sein; bei einer Reihe von Proteinen wurde eine Mikroheterogenität jedoch auch mit einem wechselnden Gehalt an protein-gebundenen Kohlenhydraten begründet (z.B. Plummer und Hirs, 1963; Oshiro und Eylar, 1968; Spiro, 1970; Esser und Minuth, 1971; Tarutani und Shulman, 1971).

Für eine Mikroheterogenität bei einigen Hämocyaninen sprechende Befunde stammen auch von Loehr und Mason (1973) sowie Carpenter und van Holde (1973) an *Cancer magister* (Crustacea), Murray und Jeffrey (1974) an *Cherax destructor* (Crustacea), besonders aber von Sullivan et al. (1974) an *Limulus polyphemus* (Xiphosura). Das letztgenannte Autorenteam isolierte strukturell und funktionell unterschiedliche " multiple " Hämocyanine,

die einer neuen Arbeit zufolge (Bonaventura et al., 1975) auch unterschiedliche Bromcyanbruchstücke liefern.

Bei allen anderen der zahlreichen Untersuchungen an Hämocyaninen ergaben sich jedoch keine gesicherten Befunde, die für eine Mikroheterogenität sprechen. So bezeichnen z.B. Kuiper et al. (1975) das Hämocyanin aus *Panulirus interruptus* (Crustacea) als homogen im Bereich der Polypeptidkette, und auch Waxman (1975) findet im Verlauf ausgedehnter Strukturuntersuchungen an den Hämocyaninen von fünf Molluskenarten und vier Arthropodenarten keinen Anlaß, diese Hämocyanine nicht als chemisch einheitlich zu betrachten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergaben sich bei den Elektrophoresen in den SDS-Systemen von Loehr und Mason (1973) sowie Kaltschmidt und Wittmann (1970/1971) Anzeichen einer Heterogenität der Vogelspinnenhämocyanine im Bereich ihrer Polypeptidketten. Alle anderen Untersuchungen wie Elektrophorese im SDS-System von Weber und Osborn (1969), analytische Disc-Elektrophorese, Gelfiltration, Isoelektrofokussierung, sowie UZ-Untersuchungen von R.Schmid (Diss., in Vorb.) lieferten hingegen keinen Hinweis auf eine Mikroheterogenität. Ein nicht einheitliches Verhalten zeigt das Hämocyanin aus *Cupiennius* bei der Denaturierung unter Verzicht auf reduzierende Agenzien. Sowohl die 16S- als auch die 24S-Einheit konnte nur zu ca. zwei Drittel der Gesamtmenge bis zur Polypeptidkette zerlegt werden. Der Rest verblieb als Dimer. Ein Drittel des *Cupiennius*-Hämocyanins bildet offenbar im Gegensatz zum übrigen Anteil intermolekulare Disulfidbrücken aus. Worauf dieses unterschiedliche Verhalten beruht, kann vorläufig nicht beurteilt werden.

Zur Klärung der Frage nach der Mikroheterogenität sollte untersucht werden, ob sich die native 5S-Einheit des Spinnenhämocyanins mittels Ionenaustauschchromatographie in mehrere Komponenten auftrennen läßt, der Arbeit von Sullivan et al. (1974) folgend.

2. Das Begleitprotein

Neben dem Hämocyanin konnte in der Hämolymphe der drei Spinnenarten noch ein weiteres Protein (" Begleitprotein ") nachgewiesen werden, dessen prozentualer Anteil am Gesamteiweiß relativ konstant ist und das sich bei den drei Spinnenarten kaum unterscheidet. Folgende Argumente könnten für eine Verwandtschaft zwischen Hämocyanin und Begleitprotein sprechen:

- a) Der Sedimentationskoeffizient des Begleitproteins (16S) ist identisch mit dem des Hämocyanin-Hexamers (Schmid, Diss. in Vorb.).
- b) Untersuchungen von Czichos-Tiedt (1975) zufolge zeigen alle Hämolympheproteine von Cupiennius Peroxidaseaktivität, d.h. sie lassen sich im Polyacrylamidgel mit Hydroperoxid/o-Dianisidin nach Manwell und Baker (1963) anfärben.
- c) Übereinstimmend mit dem Hämocyanin scheinen auch die N-terminalen Aminosäuren des Begleitproteins blockiert zu sein. R.Schmid (Diss., in Vorb.) kommt zum selben Ergebnis.
- d) Begleitproteine und Hämocyanine sind Glycoproteide mit 1-1.5 % Neutralzucker.

Die Unterschiede zwischen beiden Proteinen sind jedoch bei genauerer Untersuchung bedeutend:

- a) Die isoelektrischen Punkte von Hämocyanin und Begleitprotein liegen bei unterschiedlichen pH-Werten.
- b) Hämocyanin dissoziiert in stärker alkalischem Milieu (oberhalb pH 9.5) quantitativ bis zur 5S-Einheit, während das Begleitprotein unter diesen Bedingungen nicht dissoziiert.
- c) Das Begleitprotein zerfällt bei der Denaturierung in zwei Polypeptidketten mit Molekulargewichten von 95000 bzw. 110000 Dalton, welche bei Behandlung mit Ameisensäure bei Raumtemperatur nicht proteolytisch gespalten werden. Hämocyanin dagegen besteht aus einer gegen Ameisensäure empfindlichen Polypeptidkette vom Molekulargewicht 70000 Dalton.
- d) Die vergleichende Analyse der Aminosäurezusammensetzung ergab bei den drei Spinnenarten signifikante Unterschiede zwischen Hämocyanin und Begleitprotein.
- e) Begleitprotein ist im Gegensatz zu Hämocyanin kupferfrei, die für Hämocyanin charakteristischen spektralen Maxima bei

340 nm und 560 nm fehlen, das Begleitprotein bindet keinen Sauerstoff (Loewe, unveröffentlicht).

f) Seine Quartärstruktur wirkt im elektronenmikroskopischen Bild gestaucht pilzförmig und nicht kubisch wie die des 16S-Hämocyanins (Loewe, unveröffentlicht).

g) Die Bromcyanspaltung des Begleitproteins führte zu anderen Bruchstücken und zu anderen N-terminalen Aminosäuren als die Spaltung des Hämocyanins.

Auf Grund dieser Ergebnisse erscheint bei den drei untersuchten Spinnenarten eine Verwandtschaft zwischen Hämocyanin und Begleitprotein ausgeschlossen. Czichos-Tiedt (1975) vertrat zwar die Ansicht, das in der vorliegenden Arbeit als Begleitprotein bezeichnete Eiweiß aus *Cupiennius* enthielte eine Hämocyaninkomponente; die zunächst überzeugenden Argumente für diese Auffassung kamen jedoch auf Grund einer Verunreinigung der Begleitproteinfraktionen mit Hämocyanin zustande, wie eine Reproduktion der Isolierungsversuche ergab.

Die Frage nach Natur und Aufgabe des Begleitproteins aus Spinnenhämolymph kann bisher nicht beantwortet werden. Czichos-Tiedt (1975) wies nach, daß bei *Cupiennius* weder Geschlecht noch Jahreszeit noch Futter einen Einfluß auf die Zusammensetzung der Hämolymphproteine haben. Dies gilt, eigenen Beobachtungen zufolge, auch für die beiden Vogelspinnenarten. Das Begleitprotein ist also weder weibchenspezifisch wie das " schwere Hämocyanin " aus der Hämolymph des Krebses *Callinectes sapidus* (Horn und Kerr, 1969), noch wird es nur zur Zeit der Oocytenreifung gebildet wie das " high density Lipoprotein " aus der Hämolymph des gleichen Tieres (Horn und Kerr, 1969).

Godbillon und Frentz (1972) fanden in der Hämolymph aus *Carcinus maenas* (Crustacea) neben dem Hauptbestandteil Hämocyanin noch drei weitere Proteine, von denen eines ein kupferfreies, peroxidaseaktives Glycoprotein war. Diese Charakteristik paßt auch auf das Begleitprotein aus Spinnenhämolymph. Nähere Angaben wie Sedimentationskoeffizient, Größe der Polypeptidketten u.s.w. fehlen leider.

Fuller und Doolittle (1971) isolierten aus der Hämolymph von

Panulirus interruptus (Crustacea) ein Fibrinogen mit einem Molekulargewicht von 400000 Dalton (14.5 S), welches dimerisieren kann (19.4 S) und aus zwei Polypeptidketten in einer Größenordnung von 190000 Dalton besteht (Doolittle und Fuller, 1972). Nach den Ergebnissen der Gerinnungsversuche (s.S. 14) handelt es sich beim Begleitprotein aus Spinnenhämolymphe jedoch nicht um ein Fibrinogen. An der Gerinnung beteiligte Proteine sind bei den untersuchten Spinnenarten offenbar an die Hämocyten gebunden und werden mit diesen abzentrifugiert.

Die hämagglutinierenden Eigenschaften der Körperflüssigkeiten einiger Invertebraten sind schon seit langem bekannt (Bretting und Renwrantz, 1973). Ihre biologische Bedeutung wird vor allem in einer Schutzwirkung gesehen, sei es direkt durch Verklumpung von Bakterien oder indirekt durch eine Beteiligung bei der Phagocytose. Solche Agglutinine fanden Weinheimer (1971; in: Roche und Monsigny, 1974) in Hämolymphe aus *Panulirus interruptus* (Crustacea; 10.2 S; Polypeptidkette: 68000 Dalton), Hall und Rowlands (1974) bei *Homarus americanus* (Crustacea; 11S und 19S; Polypeptidkette: 55000 Dalton), sowie Roche und Monsigny (1974) bei *Limulus polyphemus* (Xiphosura; 13.9 S; Polypeptidkette: 19000 Dalton). Das Agglutinin ("Lectin") aus *Limulus* ist ein Glycoprotein mit 1.8 % Neutralzucker und dissoziiert im alkalischen Bereich nicht. Ob es sich beim Begleitprotein aus Spinnenhämolymphe um ein solches Agglutinin handelt, ist derzeit noch offen.

3. Chemische Analyse des Spinnenhämocyanins

a) Aminosäureanalyse: Ein Vergleich der Aminosäurezusammensetzung der Spinnenhämocyanine mit der von anderen Arthropoden sowie von Mollusken ergab eine weitgehende Ähnlichkeit. Hinweise auf phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen lassen sich jedoch daraus nicht ableiten, da die Untersuchungen von Ghiretti-Magaldi et al. (1966) gezeigt haben, daß es bezüglich der Aminosäurezusammensetzung keine signifikanten Unterschiede zwischen Mollusken- und Arthropodenhämocyanin gibt, wenn man die Variationsbreite berücksichtigt.

b) Kohlenhydratanalyse: Bei den Hämocyaninen aus der Schnecke *Helix pomatia* (Dijk et al., 1970), dem Tintenfisch *Octopus vulgaris* (Albergoni et al., 1972) sowie dem Krebs *Homarus americanus* (Waxman, 1975) ist Mannose der Hauptbestandteil der proteingebundenen Neutralzucker.

Spinnenhämocyanin enthält ebenfalls Mannose, die Hauptmenge der Neutralzucker wird jedoch durch Glucose repräsentiert. Eine Verunreinigung der Analyse mit freier Glucose wurde mit Sicherheit ausgeschlossen.

Alle oben genannten Autoren fanden außerdem Glucosamin; Neuraminsäuren fehlten dagegen stets. Beim Spinnenhämocyanin liegen die gleichen Verhältnisse vor.

Ungeklärt ist vorläufig, ob die Kohlenhydratkomponente der Spinnenhämocyanine in einer oder in mehreren Seitenketten pro 5S-Einheit vorliegt und in welcher Sequenz die Monosaccharide angeordnet sind. Die erste Frage könnte durch Kohlenhydratanalysen an den isolierten Produkten nach proteolytischer Spaltung beantwortet werden, die zweite durch schrittweises Freisetzen der Monosaccharide vom freien Ende der Kohlenhydratkette her (vermittelt schonender Hydrolyse in 0.1 N Schwefelsäure bei unterschiedlicher Versuchsdauer oder durch Glycosidasen).

c) N-terminal-Analyse: Die Versuche zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäure der Spinnenhämocyanine mit Hilfe des Dansyl-Verfahrens von Hartley (1970) verliefen negativ. Offenbar sind die Endgruppen blockiert. R.Schmid (Diss., in Vorb.) kommt unter Anwendung des Verfahrens von Edman (1950) zum gleichen Ergebnis, ebenso wie bei den Begleitproteinen. Eine weitere Absicherung dieser Ergebnisse stellt der Befund dar, daß nach Bromcyanspaltung stets Endgruppen nachzuweisen sind.

Auch die Hämocyanine aus der Schnecke *Helix pomatia* besitzen blockierte N-terminale Aminosäuren (Cox et al., 1972; Brouwer und Kuiper, 1973). Dijk et al. (1970) fanden dagegen bei der gleichen Tierart endständiges Arginin, desgleichen Stewart et al. (1973) bei Hämocyanin aus *Jasus lalandii* (Crustacea). Beide Autorenteam arbeiteten jedoch mit der Dansyl-Methode, bei der stets als Artefakt ϵ -Dansyl-Lysin auftritt, welches von Dansyl-Arginin nur schwer zu unterscheiden ist (Hartley,

1970; eigene Befunde). Das " Arginin " könnte also auf eine Verwechslung zurückgehen.

Czichos-Tiedt (1975) bestimmte bei Hämocyanin aus *Cupiennius* *Isoleucin* mittels der Methode von Edman (1950); dieser Befund erwies sich jedoch inzwischen als artifiziell (Schmid, Diss. in Vorb.).

Gut abgesichert erscheint jedoch die Bestimmung von Asparaginsäure als N-terminale Endgruppe des Hämocyanins aus *Cancer* *magister* (Carpenter und van Holde, 1973), *Panulirus* *interruptus* (Kuiper et al., 1975) und *Octopus vulgaris* (Waxman, 1975).

Die Analyse der blockierten Endgruppe des Hämocyanins aus *Homarus americanus* durch Waxman (1975) ergab die EndsequenzAsp-Glu-X .

Unter Zusammenfassung der zuverlässigen Befunde ergibt sich folgendes Bild: Ein Teil der bisher untersuchten Hämocyanine besitzt als Aminoendgruppe unblockierte Asparaginsäure, andere Hämocyanine sind am N-terminal blockiert, in einem untersuchten Fall durch einen an Asparaginsäure angehängten blockierten Glutaminsäurerest.

4. Bromcyanspaltung des Spinnenhämocyanins

An dieser Stelle sei lediglich die Bromcyanspaltung des Hämocyanins aus *Dugesia* *diskutiata* diskutiert, da nur hier die Verhältnisse eingehend untersucht wurden.

Bei der Bromcyanspaltung in 70-proz. Ameisensäure entstehen sieben Bruchstücke in unterschiedlichen Teilchenverhältnissen. Die Molekulargewichte dieser Spaltprodukte wurden durch SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese mit Hilfe von Eichproteinen bestimmt. Addiert man die ermittelten Werte ohne Rücksicht auf die Teilchenverhältnisse der Spaltprodukte, so ergibt sich 106000 Dalton als Summe, was offensichtlich zu hoch ist.

Bei näherer Betrachtung der Teilchenverhältnisse fällt jedoch auf, daß die Banden B4 (5 % ; MG 16000 Dalton) und B5 (15 % ; MG 18000 Dalton) zusammen genommen den gleichen Prozentsatz (20 %) ausmachen wie B1 (MG 6000 Dalton), B2 (MG 8000 Dalton) und B3 (MG 12000 Dalton) jeweils allein.

Auch B6 (10 % ; MG 22000 Dalton) und B7 (10 % ; MG 24000 Dalton) ergeben zusammen 20 % der Gesamtteilchenzahl. Dies deutet darauf hin, daß B4 und B5 bzw. B6 und B7 Peptide darstellen, die analoge Positionen einnehmen.

Die Unterschiede zwischen B4 und B5 bzw. B6 und B7, die sich in einem ungleichen elektrophoretischen Verhalten äußern, könnten nativ oder artifiziell sein; in beiden Fällen würde eine Hämocyanin-Polypeptidkette jedoch aus nur fünf Bruchstücken aufgebaut sein, deren Molekulargewichte in der Summe 66-68000 Dalton ergäben. Dieser Wert entspricht dem Molekulargewicht der Polypeptidkette (71000 Dalton) gut.

Im folgenden sind die beiden Möglichkeiten näher diskutiert.

(1) Die Unterschiede zwischen den analogen Peptiden sind nativ:

In diesem Fall ergibt die paarweise Kombination dieser Bruchstücke vier verschiedene Polypeptidketten:

I) B1/B2/B3/B4/B6 ; B1/B2/B3/B4/B7

II) B1/B2/B3/B5/B6 ; B1/B2/B3/B5/B7

Das Teilchenverhältnis zwischen B4 und B5 ist jedoch 1 : 3 ; infolgedessen wäre nur eine der Ketten "I" realisiert. Eine der Ketten "II" läge dafür in doppelter Menge vor.

Diese Vorstellung würde mit der Beobachtung übereinstimmen, daß im SDS-System nach Kaltschmidt und Wittmann (1970/1971) drei Polypeptidketten im Verhältnis 1 : 2 : 1 auftreten.

Dem Bruchstück B4, welches nur 5 % der Spaltprodukte ausmacht, könnte die in vergleichsweise sehr geringen Mengen vorliegende N-terminale Endgruppe Glycin zugehörig sein. Es verbleiben auf Grund der Ergebnisse der Endgruppenbestimmung (s.S. 47) die vier N-terminalen Aminosäuren Isoleucin (2x), Leucin, Valin und Asparaginsäure einerseits und sechs Bruchstücke andererseits, von denen jedoch B6 und B7 nur in vergleichsweise halber Menge vorliegen. Unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse wurde eine Endgruppe zu viel ermittelt, wenn man bedenkt, daß das Aminoende der Polypeptidkette blockiert ist.

(2) Die Unterschiede zwischen den analogen Peptiden sind artifiziell:

Treten die Unterschiede erst im Verlauf der Bromcyanspaltung

auf, so würde dies einerseits der Vorstellung von einer einheitlichen Polypeptidkette entsprechen, die durch Bromcyan in fünf Bruchstücke gespalten wird, deren summierte Molekulargewichte 66-68000 Dalton ergeben. Den fünf Bruchstücken kämen unter der Annahme, daß der schwache Glycinfleck artifiziell ist, fünf Endgruppen zu. Dies ist eine zu viel, denn eines der Bruchstücke steht mit einer blockierten N-terminalen Aminosäure am Anfang der Polypeptidkette.

Andererseits bleibt jedoch die Frage nach dem für die Unterschiede verantwortlichen chemischen Mechanismus. Eine mögliche Erklärung stammt von Ambler (1965). Nach dessen Befunden können ursprünglich identische Bromcyanspaltprodukte entweder Homoserin oder aber Homoserin-Lacton als C-terminale Endgruppe besitzen, was sich in einem unterschiedlichen elektrophoretischen Verhalten äußert.

Eine Entscheidung, ob die eine, die andere oder gar beide Möglichkeiten vorliegen, kann an Hand der durchgeführten Experimente nicht getroffen werden. Hierzu sind Untersuchungen an isolierten Bromcyanbruchstücken notwendig.

Die Bromcyanspaltung in 70-proz. Ameisensäure führt, entsprechend den oben diskutierten Vorstellungen, nur zu fünf statt der beobachteten sieben Bruchstücken.

Die Bromcyanspaltung in 0.1 N Salzsäure ergibt dagegen elektrophoretisch nicht aufgetrennte Bruchstücke in einer Größenordnung von ca. 24000 Dalton.

Inkubation mit 0.1 N Salzsäure allein induziert keine proteolytischen Spaltungen; in 70-proz. Ameisensäure zeigen sich jedoch Bruchstücke mit Molekulargewichten von 36000, 18000 und 54000 Dalton, wobei ersteres mengenmäßig weit überwiegt.

Im folgenden ist ein Versuch dargestellt, diese scheinbar widersprüchlichen Befunde auf einen gemeinsamen Nenner zu bringen. In Abbildung 24 ist der hypothetische Aufbau einer Hämocyanin-Polypeptidkette aus ihren Bromcyanbruchstücken wiedergegeben, auf Grund dessen sich die unterschiedlichen Ergebnisse erklären ließen unter der Bedingung, daß die nur durch Ameisensäure induzierten proteolytischen Spaltungen in

Gegenwart von Bromcyan in 24 Stunden quantitativ ablaufen.

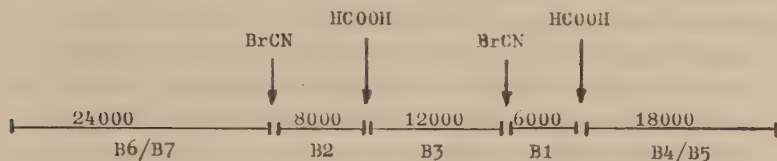


Abb.: 24: Hypothetischer Aufbau der Polypeptidkette von Dugesiella-Hämocyanin aus ihren Bromcyanspaltprodukten. Die Bruchstücke B4 und B5 sowie B6 und B7 sollen analoge Positionen einnehmen. Zwei Bindungsstellen werden allein durch Bromcyan, die anderen beiden nur durch Ameisensäure gespalten.

Diese Polypeptidkette würde je nach verwendeten Agenzien folgende Spaltprodukte ergeben (Tabelle 6):

Tabelle 6: Spaltprodukte der hypothetischen Polypeptidkette aus Abb. 24 sowie tatsächlich beobachtete Spaltprodukte nach Inkubation mit 0.1 N HCl/Bromcyan, 70-proz. HCOOH und 70-proz. HCOOH/Bromcyan.

Bedingungen	Spaltprodukte der hypothetischen Polypeptidkette (MG in Dalton)	Spaltprodukte des Hämocyanins aus Dugesiella (MG in Dalton)
HCl/Bromcyan	24000 ; 20000 ;	24000 (breite Bande);
HCOOH	36000 ; 32000 ; 54000 ; 18000 ;	36000 (breite Bande); 54000 ; 18000 ;
HCOOH/Bromcyan	24000 ; 18000 ; 12000 ; 8000 ; 6000 ;	24000 ; 18000 ; 12000 ; 8000 ; 6000 ;

Diese Hypothese steht zu keinem Befund im Widerspruch und könnte viele Beobachtungen besser verständlich machen. Eine endgültige Klärung kann jedoch auch hier nur durch Untersuchung isolierter Spaltprodukte erfolgen.

Eine Klärung bedarf außerdem der Umstand, daß bei einem Methioningehalt von 10 bis 12 Molekülen pro Polypeptidkette nur so wenige Bromcyanbruchstücke gefunden werden. Allerdings ist die

Existenz von Met-Met-Sequenzen sowie das Auftreten sehr kleiner, mit den bisherigen Methoden nicht erfaßter Bruchstücke keineswegs ausgeschlossen. Für das zweite Argument spricht der Umstand, daß am Gemisch der Bromcyanbruchstücke eine Endgruppe mehr gefunden wird, als den Spaltprodukten unter Berücksichtigung der blockierten N-terminalen Aminosäure der Polypeptidkette zugeordnet werden kann (s.S. 59, 60).

Eine Stütze würden die Ergebnisse der Bromcyanspaltung des Hämocyanins aus *Dugesia* auch durch die Befunde anderer Autoren erhalten. Waxman (1975) fand bei Bromcyanspaltung (in 70-proz. Ameisensäure) des Hämocyanins aus *Homarus americanus* (Crustacea) vier Bruchstücke (MG 20000, 10000, 7000 und 4000 Dalton), obwohl die Polypeptidkette zwölf Methioninreste besitzt, und schloß daraus auf eine Sequenzverdoppelung. Die " multiplen " Hämocyanine aus *Limulus polyphemus* wurden von Bonaventura et al. (1975) nach ihrer Isolierung mit Bromcyan behandelt. Beim Hämocyanin "I" traten vier Bruchstücke auf (MG 24600, 16800, 12600 und 9750 Dalton). Angaben über das für die Spaltung verwendete Lösungsmittel fehlen leider. Dennoch ist die Ähnlichkeit zu den Spaltprodukten des Hämocyanins aus *Dugesia* offensichtlich. Die Polypeptidkette des Hämocyanins aus *Limulus* enthält 15 Methioninreste (Ghiretti-Magaldi et al., 1966).

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Die Hämolympheproteine der Spinne *Cupiennius salei* bestehen zu 75 % aus Hämocyanin und zu 25 % aus einem Begleitprotein unbekannter Funktion. Das Hämocyanin liegt in Form zweier Komponenten vor (16S und 24S), welche als Hexamer bzw. Dodekamer der kleinsten funktionellen Einheit aufzufassen sind. Das Begleitprotein (16S) verhält sich elektrophoretisch einheitlich; es wandert in der analytischen Disc-Elektrophorese etwas langsamer als das 16S-Hämocyanin.

Die Hämolympheproteine der Vogelspinnen *Dugesia californica* und *Eurypelma helluo* bestehen zu 80 % aus Hämocyanin (37S) und zu 20 % aus Begleitprotein (16S); beide verhalten sich elektrophoretisch einheitlich.

2. Vermittels Gelfiltration, Isoelektrofokussierung und präparativer Disc-Elektrophorese gelingt die Isolierung aller nativen Hämocyaninkomponenten und der Begleitproteine der drei Spinnenarten im präparativen Maßstab.

3. Die isoelektrischen Punkte der Vogelspinnen-Hämocyanine liegen bei pH 5.1, der von *Cupiennius*-Hämocyanin bei pH 5.2 .

4. Die Denaturierung des Hämocyanins führt bei Verwendung von SDS, Harnstoff, Guanidin-HCl, 0.1 N HCl oder 70-proz. HCOOH in Gegenwart von reduzierenden Agenzien stets quantitativ bis zur Polypeptidkette, die mit der kleinsten funktionellen Unter-einheit (5S) identisch ist. Bei Verzicht auf reduzierende Agenzien während der Denaturierung verbleibt bei *Cupiennius* ein Drittel des Hämocyanins in Form des Dimers (MG ca. 140000 Dalton).

5. Die SDS-Molekulargewichtsbestimmung der Hämocyanin-Polypeptidketten ergab 72000 Dalton für *Cupiennius*, 71000 Dalton für *Dugesia* und 74000 Dalton für *Eurypelma*.

Die durch die Protein/Kupfer-Relation ermittelten Molekulargewichte betrugen 74000 Dalton bei *Cupiennius* und 73000 Dalton bei den Vogelspinnen. Jede Polypeptidkette besitzt zwei Kupferatome.

6. Die N-terminalen Aminosäuren der Spinnenhämocyanine sind blockiert.

7. Die Aminosäurezusammensetzung der Spinnenhämocyanine zeigt eine deutliche Verwandtschaft zu jener der bisher untersuchten Hämocyanine aus Mollusken und Arthropoden.

8. Die drei Spinnenhämocyanine enthalten ca. 1.4 % Neutralzucker (Glucose, Mannose, Arabinose und Fucose) sowie ca. 0.4 % Glycosamin.

9. Die Inkubation mit 70-proz. HCOOH führt zunächst zur Denaturierung (zur 70000 Dalton-Einheit), im weiteren Verlauf jedoch zur proteolytischen Spaltung, wobei im wesentlichen eine Komponente von ca. 35000 Dalton entsteht. Bei dieser Spaltung werden keine N-terminalen Aminosäuren freigesetzt.

10. Die Bromcyanspaltung des Hämocyanins aus *Dugesia* ergibt bei Durchführung in 0.1 N HCl eine elektrophoretisch einheitliche, breite Bande vom MG 24000 Dalton, bei Durchführung in 70-proz. HCOOH entstehen dagegen sieben Bruchstücke (Teilchenverhältnisse in Klammern): B1: 6000 Dalton (20 %), B2: 8000 Dalton (20 %), B3: 12000 Dalton (20 %), B4: 16000 Dalton (5 %), B5: 18000 Dalton (15 %), B6: 22000 Dalton (10 %) und B7: 24000 Dalton (10 %).

Am Gemisch der Bromcyanbruchstücke (in HCOOH) lassen sich 5 N-terminale Aminosäuren nachweisen (Ile, Leu, Val, Asp, Gly). Der Isoleucinanteil liegt etwa in doppelter Menge vor, der Glycinanteil ist dagegen sehr gering.

11. Die Begleitproteine der drei Spinnenarten zeigen kein Absorptionsmaximum bei 340 nm und besitzen weder Kupfer noch Eisen. Ihr isoelektrischer Punkt liegt bei pH 5.5; sie dissoziieren im alkalischen unter den gewählten Versuchsbedingungen (pH 10.1; 10 mM EDTA) nicht. Bei der Denaturierung zerfallen sie quantitativ in zwei Polypeptidketten vom Molekulargewicht 95000 Dalton und 110000 Dalton.

12. Die Begleitproteine werden in 70-proz. HCOOH bei Raumtemperatur nicht proteolytisch gespalten. Sie besitzen 0.9 % proteingebundene Glucose; ihre N-terminalen Aminosäuren sind blockiert. Bezüglich der Aminosäurezusammensetzung sowie der Anzahl, Größe und Aminoendgruppen ihrer Bromcyanspaltprodukte bestehen signifikante Unterschiede zu den Hämocyaninen. Eine Verwandtschaft zu den Hämocyaninen wird daher ausgeschlossen.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Albergoni, V., Cassini, A., Salvato, B.: The carbohydrate portions of the hemocyanin from *Octopus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol.* 41B, 445-451 (1972).
- Ambler, R.P.: The behaviour of peptides formed by cyanogen bromide cleavage of proteins. *Biochem. J.* 96, 32p (1965).
- Bencze, W.L., Schmid, K.: Determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Anal. Chem.* 29, 1193-1196 (1957).
- Bolling, D. in: The amino acid composition of proteins and foods (R.J. Block and D. Bolling, eds.), 2nd ed., C.C.Thomas, Springfield, Ill. (1951).
- Bonaventura, J., Bonaventura, C., Sullivan, B.: Hemoglobins and hemocyanins: Comparative aspects of structure and function. *J. Exp. Zool.* 194, 155-174 (1975).
- Bramhall, S., Noack, N., Wu, M., Loewenburg, J.R.: A simple colorimetric method for determination of protein. *Anal. Biochem.* 31, 146-148 (1969).
- Bretting, H., Renwantz, L.: Untersuchungen von Invertebraten des Mittelmeeres auf ihren Gehalt an hämagglutinierenden Substanzen. *Z. Immun.-Forsch.* 145, 242-249 (1973).
- Brouwer, M., Kuiper, H.A.: Molecular-weight analysis of *Helix pomatia* α -hemocyanin in guanidine hydrochloride, urea and sodium dodecylsulfate. *Eur. J. Biochem.* 32, 428-435 (1973).
- Carpenter, D.E., van Holde, K.E.: Amino acid composition, amino-terminal analysis, and subunit structure of Cancer magister hemocyanin. *Amer. Chem. Soc.* 12, 2231-2238 (1973).
- McCarthy, T.E., Sullivan, M.X.: A new and highly specific colorimetric test for methionine. *J. Biol. Chem.* 141, 871-876 (1941).
- Comstock, J.H.: The spider book (W.J. Gertsch ed.). Ithaka, New York. Comstock publishing associates 1965.
- Cox, J., Witters, R., Lontie, R.: The quaternary structure of *Helix pomatia* hemocyanins as determined by alkali treatment and succinylation. *Int. J. Biochem.* 2, 283-293 (1972).
- Czichos-Tiedt, S.: Versuche zur Reinigung und Charakterisierung des Hämocyanins aus der Spinne *Cupiennius salei* Keyserling. Dissertation, München 1975.
- Dijk, J., Brouwer, M., Coert, A., Gruber, M.: Structure and function of hemocyanins.VII. The smallest subunit of α - and β -hemocyanin of *Helix pomatia*: Size, composition, N- and C-terminal amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* 221, 467-479 (1970).
- Doolittle, R.F., Fuller, G.M.: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis studies on Lobster fibrinogen and fibrin. *Biochim. Biophys. Acta* 263, 805-809 (1972)

- Edman, P.: Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.* 4, 283-293 (1950).
- Ellerton, H.D., Carpenter, D.E., van Holde, K.E.: Physical studies of hemocyanins. V. Characterization and subunit structure of the hemocyanin of Cancer magister. *Biochem.* 9, 2225-2232 (1970).
- Esser, K., Minuth, W.: The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. Microheterogeneity of Laccase II. *Eur. J. Biochem.* 23, 484-488 (1971).
- Fuller, G.M., Doolittle, R.F.: Studies of invertebrate fibrinogen. I. Purification and characterization of fibrinogen from the spiny lobster. *Biochem.* 10, 1305-1311 (1971).
- Gainer, H.: Isoelectric focusing of proteins at the 10^{-10} -g level. *Anal. Biochem.* 51, 646-650 (1973).
- Di Giamberardino, L.: Dissociation of Eriphia hemocyanin. *Arch. Biochem. Biophys.* 118, 273-278 (1967).
- Ghiretti, F. ed.: Physiology and biochemistry of hemocyanins. London and New York: Academic press 1968.
- Ghiretti-Magaldi, A., Nuzzolo, C., Ghiretti, F.: Chemical studies on hemocyanins. I. Amino acid composition. *Biochem.* 5, 1943-1951 (1966).
- Godbillon, G., Frentz, R.: The protein fractions with peroxidase activity revealed in the haemolymph of *Carcinus maenas* L. (decapod crustacean) after electrophoretic separation on cellulose acetate. *C.r. séances; acad. sci. Paris*, sér. D. 275 (14), 1531-1534 (1972).
- Haglund, H.: Isoelectric focusing in pH gradients - A technique for fractionation and characterization of ampholytes. LKB-Produkt AB, Stockholm, Schweden 1972.
- Hall, J.L., Rowlands jr., D.T.: Heterogeneity of lobster agglutinins. I. Purification and physicochemical characterization. *Biochemistry* 13, 821-827 (1974).
- Hartley, B.S.: Strategy and tactics in protein chemistry. *Biochem. J.* 119, 805-822 (1970).
- Van Holde, K.E., van Bruggen, E.F.J.: In: Subunits in biological systems (Timasheff, S.N., Fasman, G.D., eds.), New York, Marcel Dekker, 1971.
- Horn, E.C., Kerr, M.S.: The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes sapidus*-I. Hemocyanins and certain other major protein constituents. *Comp. Biochem. Physiol.* 29, 493-508 (1969).
- Kahn, R., Rubin, R.W.: Quantitation of submicrogram amounts of protein using Coomassie Brilliant Blue R on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide slab-gels. *Anal. Biochem.* 67, 347-352 (1975).
- Kaltschmidt, E.: Ribosomal proteins. XIV. Isoelectric points of ribosomal proteins of *E. coli* as determined by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 43, 25-31 (1971).

- Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G.: Ribosomal proteins. VII. Two-dimensional polyacrylamid gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. *Anal. Biochem.* 36, 401-412 (1970).
- Klotz, I.M., Klotz, T.A.: Oxygen-carrying proteins: A comparison of the oxygenation reaction in hemocyanin and hemerythrin with that in hemoglobin. *Science* 121, 477-480 (1955).
- Konings, W.N., Siezen, R.J., Gruber, M.: Structure and properties of hemocyanins. VI. Association-dissociation behaviour of *Helix pomatia* hemocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 194, 376-385 (1969).
- Kuiper, H.A., Gaastra, W., Beintema, J.J., van Bruggen, E.F.J., Schepman, A.M.H., Drenth, J.: Subunit composition, X-ray diffraction, amino acid analysis and oxygen binding behaviour of *Panulirus interruptus* hemocyanin. *J. Mol. Biol.* 99, 619-629 (1975).
- Loehr, J.S., Mason, H.S.: Dimorphism of Cancer magister hemocyanin subunits. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 51, 741-745 (1973).
- Loewe, R.: Hämocyanin in der Hämolymphe zweier Spinnen, *Dugesia californica* und *Cupiennius salei* Keyserling. Dissertation, München 1972.
- Loewe, R., Linzen, B.: Haemocyanins in spiders. I. Subunits and stability region of *Dugesia californica* haemocyanin. *Z. Physiol. Chem. (Hoppe-Seyler's)* 354, 182-188 (1973).
- Loewe, R., Linzen, B.: Haemocyanins in spiders. II. Automatic recording of oxygen binding curves, and the effect of Mg^{++} on oxygen affinity, cooperativity, and subunit association of *Cupiennius salei* haemocyanin. *J. Comp. Physiol.* 98, 147-156 (1975).
- Loewe, R., Linzen, B., v. Stackelberg, W.: Die gelösten Stoffe in der Hämolymphe einer Spinne, *Cupiennius salei* Keyserling. *Z. vergl. Physiol.* 66, 27-34 (1970).
- Lontie, R.: The binding of copper in haemocyanins. *Clin. Chim. Acta* 3, 68-71 (1958).
- Lontie, R., De Ley, M., Robberecht, H., Witters, R.: Isolation of small functional subunits of *Helix pomatia* hemocyanin after subtilisin treatment. *Nature* 242, 180-182 (1973).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951).
- Macko, V., Stegeman, H.: Free electrofocusing in a coil of polyethylene tubing. *Anal. Biochem.* 37, 186-190 (1970).
- Manwell, C., Baker, C.M.A.: Starch gel electrophoresis of sera from some marine arthropods: Studies on the heterogeneity of hemocyanin and on a "ceruloplasmin-like protein". *Comp. Biochem. Physiol.* 8, 193-208 (1963).
- Maurer, H.R.: Disc-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co, Berlin, 1968.

- Melchers, M.: Zur Biologie und zum Verhalten von *Cupiennius salei* (Keyserling), einer amerikanischen Ctenide.
Zool. Jb., Abt. System., Ökol. u. Geogr. 91, 1-90 (1963).
- Miller, D.W., Elgin, S.C.R.: Isoelectric focusing of proteins exposed to sodium dodecyl sulfate.
Anal. Biochem. 60, 142-148 (1974).
- Murray, A.C., Jeffrey, P.D.: Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor*. Subunit heterogeneity. Biochem. 13, 3667-3671 (1974).
- Oshiro, Y., Eylar, E.H.: Physical and chemical studies on glycoproteins. III. The microheterogeneity of Fetuin, a fetal calf serum glycoprotein.
Arch. Biochem. 127, 476-498 (1968).
- Pickett, S.M., Riggs, A.F., Larimer, J.L.: Lobster hemocyanin: Properties of the minimum functional subunit and of aggregates. Science 151, 1005-1007 (1966).
- Plummer, T., Hirs, C.: The isolation of Ribonuclease B, a glycoprotein from bovine pancreatic juice.
J. Biol. Chem. 238, 1396-1401 (1963).
- Radola, B.J.: Isoelectric focusing in layers of granulated gels. II. Preparative isoelectric focusing.
Biochim. Biophys. Acta 386, 181-195 (1975).
- Rizzotti, M.: On the quaternary structure of *Carcinus maenas* (arthropoda) hemocyanin. Experientia 30, 1201-1202 (1974).
- Roche, J.: (1934) in: Ghiretti, F. " Oxygenases ", p. 532, Acad. Press, New York and London, 1962.
- Roche, A.C., Monsigny, M.: Purification and properties of Limulin: A lectin (agglutinin) from hemolymph of *Limulus polyphemus*. Biochim. Biophys. Acta 371, 242-254 (1974).
- Roe, J.H.: The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. J. Biol. Chem. 212, 335-343 (1955).
- Roe, J.H., Rice, E.W.: A photometric method for the determination of free pentoses in animal tissues.
J. Biol. Chem. 173, 507-512 (1948).
- Roxby, R., Miller, K., Blair, D.P., van Holde, K.E.: Subunits and association equilibria of *Callinassa californiensis* hemocyanin. Biochem. 13, 1662-1668 (1974).
- Salvato, B., Ghiretti-Magaldi, A., Ghiretti, F.: Acid-base titration of hemocyanin from *Octopus vulgaris* Lam.
Biochem. 13, 4778-4783 (1974).
- Salvato, B., Sartore, S., Rizzotti, M., Ghiretti-Magaldi, A.: Molecular weight determination of polypeptide chains of molluscan and arthropod hemocyanins.
FEBS Letters 22, 5-7 (1972).
- Schmid, R.: Chemisch-physikalische Untersuchungen an Spinnen-hämocyaninen und ihren Untereinheiten.
Dissertation, München 1976.

- Siezen, R.J., van Bruggen, E.F.J.: Structure and properties of hemocyanins. XII. Electron microscopy of dissociation products of *Helix pomatia* α -hemocyanin: Quarternary structure. *J. Mol. Biol.* 90, 77-89 (1974).
- Siezen, R.J., van Driel, R.: Structure and properties of hemocyanins. VIII. Mikroheterogeneity of α -hemocyanin of *Helix pomatia*. *Biochim. Biophys. Acta* 295, 131-139 (1973).
- Spiro, R.G.: Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 39, 599-638 (1970).
- Stewart, L.B., Fleming, J.S., Ellerton, H.D.: Physical studies on the hemocyanin from *Jasus lalandii*. *Proc. Aust. Biochem. Soc.* 6, 23 (1973).
- Stoffyn, P.J., Jeanloz, R.W.: Identification of amino sugars by paper chromatography. *Arch. Biochem.* 52, 373-379 (1954).
- Sullivan, B., Bonaventura, J., Bonaventura, C.: Functional differences in the multiple hemocyanins of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 2558-2562 (1974).
- Svennerholm, L.: Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloride acid method. *Biochim. Biophys. Acta* 24, 604-611 (1957).
- Tarutani, O., Shulman, S.: Properties of carbohydrate-stripped Thyroglobulin. II. Heterogeneity in sialic acid content in Thyroglobulin subfractions. *Biochim. Biophys. Acta* 236, 384-390 (1971).
- Waxman, L.: The structure of arthropod and mollusc hemocyanins. *J. Biol. Chem.* 250, 3796-3806 (1975).
- Weber, K., Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412 (1969).
- Weber, K., Pringle, J.R., Osborn, M.: Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. In: *Meth. Enzymol.* (Hirs, C.H.W., Timasheff, S.N., eds.), Vol. XXVI, pp 3-27, N.Y. Academic Press 1972.
- Weiner, A.M., Platt, T., Weber, K.: Amino-terminal sequence analysis of proteins purified on a nanomole scale by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 247, 3242-3251 (1972).
- Witters, R., Lontie, R.: Stability regions and amino acid composition of gastropod haemocyanins. In: *Physiology and biochemistry of haemocyanins* (F. Ghiretti ed.), p. 6-73. London and New York, Acad. Press 1968.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 18.12.1947 als Sohn des Geschäftsmannes Georg Markl und seiner Frau Ursula in Bischofswiesen (Kreis Berchtesgaden) geboren. Nach 4 Volksschuljahren in München (1954 - 1958) brachten es berufliche Veränderungen meines Vater mit sich, daß ich die Gymnasialzeit zunächst in Hamburg (1958 - 1962), dann in Grafing (Kreis Ebersberg) (1962 - 1964) und schließlich in Stuttgart verbrachte, wo ich 1967 am Schickhardt-Gymnasium das Abitur bestand.

Nach der Bundeswehr begann ich im Sommersemester 1969 an der Universität Stuttgart die Fächer Biologie / Chemie zu studieren und wechselte nach 4 Semestern an die Universität München, wo ich im Herbst 1973 in den gleichen Fächern das Staatsexamen ablegte. Im Februar 1974 begann ich mit der vorliegenden Promotionsarbeit.

Ich bin seit Dezember 1975 verheiratet.

